

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-185662
 (43)Date of publication of application : 03.07.2003

(51)Int.CI.

G01N 33/53
 G01N 27/02
 G01N 27/22
 G01N 27/27
 G01N 27/327
 G01N 37/00

(21)Application number : 2002-260276

(71)Applicant : MASSACHUSETTS INST OF TECHNOL <MIT>
 BAYLOR COLLEGE MEDICINE
 HOUSTON ADVANCED RESEARCH CENTER

(22)Date of filing : 23.04.1993

(72)Inventor : HOLLIS MARK A
 EHRLICH DANIEL J
 MURPHY R ALLEN
 KOSICKI BERNARD B
 RATHMAN DENNIS D
 CHEN CHANG-LEE
 MATHEWS RICHARD H
 BURKE BARRY E
 EGGERS MITCH D
 HOGAN MICHAEL E
 VARMA RAJENDER SINGH

(30)Priority

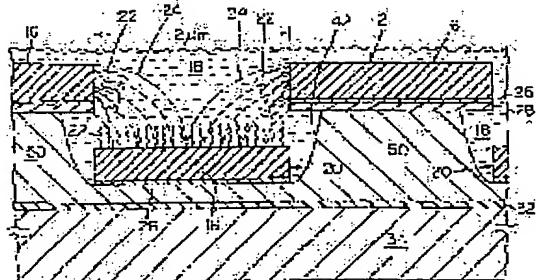
Priority number : 1992 872582 Priority date : 23.04.1992 Priority country : US

(54) OPTICAL AND ELECTRIC METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING MOLECULE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make clear an apparatus for specifying a molecular structure in a sample substance.

SOLUTION: The apparatus for determining the presence of a molecular structure in a substance is equipped with the supply source of the substance, a number of supply sources of a solution including a known molecule that is bonded to various kinds of molecules in a specific shape, a mixing means for selectively mixing each of the solution with the substance, and a detector for detecting the appearance of the bonding between the known molecule and molecular structure in the substance in the mixed solution.



[Date of final disposal for application]

[Patent_number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-185662

(P2003-185662A)

(43)公開日 平成15年7月3日(2003.7.3)

(51)IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコート(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 6 0
27/02		27/02	Z
27/22		27/22	Z
27/27		37/00	1 0 2
27/327		27/30	3 5 7
審査請求 有 請求項の数 5 OL (全 25 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-260276(P2002-260276)
 (62)分割の表示 特願平5-519396の分割
 (22)出願日 平成5年4月23日(1993.4.23)
 (31)優先権主張番号 872, 582
 (32)優先日 平成4年4月23日(1992.4.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)

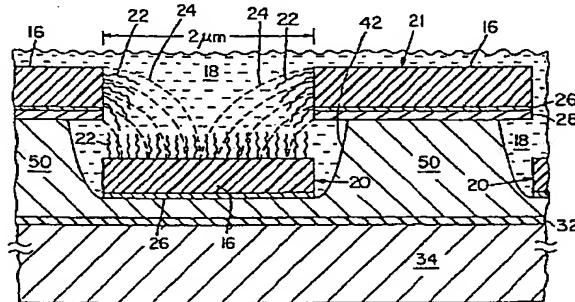
(71)出願人 591013573
 マサチューセッツ・インスティチュート・
 オブ・テクノロジー
 MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139,
 ケンブリッジ・マサチューセッツ・アベ
 ニュー 77
 (74)代理人 100087941
 弁理士 杉本 修司 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子検出の為の光学的および電気的方法ならびに装置

(57)【要約】

【課題】試料物質中の分子構造を特定するための装置を明らかにする。
 【解決手段】物質中の分子構造の存在を決定する為の下記の要件を具備する装置。上記物質の供給源、各種の分子と特定の形で結合する既知の分子を含む溶液の多数の供給源、上記溶液の各々と上記物質とを選択的に混合する混合手段、および、物質の中での既知の分子と分子構造との間の結合が、混合された溶液内で出現するのを検出する検出器。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程を具備する分子構造を特定化する為の方法：

a) テスト部位のアレーを形成し、各部位は特定の分子構造との結合の可能なプローブをその中に形成され、各テスト部位でのプローブが他のテスト部位のプローブとは異なり；

b) テスト部位に試料物質を供給し；

c) テスト信号をテスト部位に送り； および

d) 送られた信号から生じるテスト部位の特性を検出すことにより、何れのプローブが試料物質の分子構造に結合したかを判定して、多数の分子構造を識別する。

【請求項2】 請求項1の方法において、テスト信号が電磁信号であり、且つ上記アレーを下記の工程で形成する：

a) 基板の上の第1の層を形成し；

b) 第1層の上に第2の層を形成し；

c) 第1層の一部を露出する為に第2層中に第1層への開口を形成し； および

d) 開口の中に1対の電極を形成して、この電極に上記テスト信号を送る。

【請求項3】 請求項2の方法において、上記1対の電極を形成する際に、開口が形成された後に第2層上にメタライジングを施し； 上記のメタライジングは、開口間の第2層の表面上に上部電極を、第1層の露出した部分に下部電極を形成する。

【請求項4】 請求項3の方法において、基板はシリコンを使用し、第1及び第2層はシリコンを主成分とする誘電体を使用する。

【請求項5】 請求項4の方法において、第1及び第2層は夫々 SiO_2 及び Si_3N_4 であり、且つメタライジングは Al 、 Ti 、 Pt 、 W 、 Ta 、及びそれらのケイ化物又は Al_2O_3 を用いる。

【請求項6】 請求項1の方法において、上記検出の工程は、テスト部位の誘電体的特性を検出することを含む。

【請求項7】 請求項1の方法において、電気信号を送る工程は、パルス化された又は周波数の変化する信号を送ることを含む。

【請求項8】 請求項1の方法において、各テスト部位は、電気信号の周波数域内で共振性を持つ共振構造を用いて形成される。

【請求項9】 請求項8の方法において、上記検出工程は、Qに於ける変化又は共振構造の共振周波数の変化の検出を含む。

【請求項10】 請求項1の方法において、上記試料物質は溶液又はゲルの中にある。

【請求項11】 試料物質の中の分子構造を特定化する為の下記の要件を具備する装置：

a) 試料物質を受け入れる為の基板上に形成されたテス

10

ト部位、しかも各テスト部位はその中に行及び列電極を形成されており、且つ各部位に於いてそれぞれの電極に延びる行及び列リードを持つ構造である；

b) 分子構造に結合する為の上記テスト部位に形成されたプローブ；

c) テスト部位の電極に電子信号を送る為の回路； および

d) 何れのプローブが試料物質の分子構造に結合したかを断定する為に、テスト部位の電気的性質を検出する回路。

10

【請求項12】 請求項11の装置において、テスト部位の下に形成された抵抗のアレーを含む。

【請求項13】 請求項11の装置において、上記電極は、ベースから延びる多数の導電性フィンガを含む。

10

【請求項14】 請求項13の装置において、上記フィンガの間の間隔は約30ミクロン未満である。

20

【請求項15】 請求項14の装置において、上記多数の電極フィンガの第1のものは、上記基板の中に形成された多数の凹部の下部に配置され、上記多数の電極フィンガの第2のものは、上記第1フィンガの上の基板上に配置されている。

20

【請求項16】 請求項11の装置において、上記プローブが、細胞プローブ、抗体プローブ又はペプチドプローブを含む基からの分子プローブを含む。

20

【請求項17】 試料物質中の分子構造の存在を断定する為の下記の要件を具備する装置：

20

a) 試料物質を受け入れる為の基板上に形成されたテスト部位アレー；

b) 分子構造に結合する為のテスト部位に形成されたプローブ； および

30

c) 多数の検出器を持つ検出器アレーを備え、各検出器は該当のテスト部位に隣接して配置され、しかも放射は上記テスト部位を通って伝播し、且つ結合されたプローブを持つ部位ではプローブの結合されていないテスト部位とは異なった度合いで吸収され、さらに、この吸収度合いの差異は上記検出器により感知されて試料物質内の分子構造の存在を特定する為の信号を発信するために使用されている。

30

【請求項18】 請求項17の装置において、上記テスト部位アレーは、検出器アレーとは切り離すことの出来る使い捨ての可能なプレートを以って形成されている。

40

【請求項19】 請求項17の装置において、テスト部位アレーが、検出器アレーと一体的に形成されることにより、一体的な構造を形成する。

40

【請求項20】 請求項18の装置において、使い捨てプレートは石英、ガラス、プラスチックス、 Al_2O_3 又はポリイミドにより形成されている。

50

【請求項21】 請求項11の装置において、各テスト部位に於ける電極が、伝送ラインにより互いに接合されている。

50

【請求項22】 試料物質の中に分子構造の存在するこ

とを決定する為の下記の要件を具備する回路：

- a) 基板；
- b) 上記基板に形成されている多数のテスト部位；
- c) テスト部位の各々の中に形成されている電極；
- d) 電極の各々に延びるリード；及び
- e) 該当のテスト部位に形成されるプローブを備え、各テスト部位の上記プローブが構造的に同じであり、且つ異なったテスト部位のプローブは該当の予め定められた分子構造との結合の為に異なった構造である。

【請求項23】 請求項11の装置において、更に、上記電極の一つにトランジスタスイッチを介して接合されるアドレスリードを含む。

【請求項24】 請求項17の装置において、放射が、テスト部位に於ける、放射性、蛍光性又は化学発光性の標識により生成されている。

【請求項25】 請求項17の装置において、放射が、テスト部位の光子照射により励起された2次放射により生成されている。

【請求項26】 請求項17の装置において、放射が赤外放射であり、且つ検出器は熱エネルギーを感知するものである。

【請求項27】 必要な場所に分子プローブを合成する為の下記の要件を具備する装置：

- a) 合成されるべき分子を含むテスト部位のアレー；
- b) 選ばれた部位に光を照射して、その選ばれた部位に於いて分子の合成を誘発させる光源。

【請求項28】 請求項27の装置において、上記光が可視波長域に在り、且つ光化学合成を生じさせるものである。

【請求項29】 請求項27の装置において、上記光源が、テスト部位毎に走査されて局所的な合成を誘発するさせるレーザである。

【請求項30】 請求項27の装置において、上記光線が、選ばれたテスト部位の局所的な加熱を誘発することにより、分子の熱合成を行わしめるものである。

【請求項31】 請求項27の装置において、上記分子がオリゴヌクレオチド鎖を持つ。

【請求項32】 必要な場所で分子プローブを合成する為の下記の要件を具備する装置：

- a) 反応すべき前駆体分子を含むテスト部位のアレー；
- b) テスト部位アレーに隣接する部位に配置され、且つ各抵抗を該当のテスト部位の近傍に持つ抵抗のアレー；および
- c) 各テスト部位に於いて、分子を合成する為の熱反応を誘発させるために、各抵抗を加熱する電源に各抵抗を接続する接続手段。

【請求項33】 請求項1の装置において、上記テスト部位アレー及び抵抗アレーが一体化された構造として形成されている。

【請求項34】 必要な場所に分子構造を合成する為の

下記の要件を具備する装置：

- a) 反応すべき前駆体分子を含むテスト部位のアレーを有し；
- b) 各テスト部位は、該当のテスト部位に於いて分子を合成する反応を誘発する為の電源に接続された電極を含む。

【請求項35】 請求項1の装置において、アレー及び電極は、一体化された構造として形成されている。

【請求項36】 物質中の分子構造の存在を決定する為の下記の要件を具備する装置：

- a) 上記物質の供給源；
- b) 各種の分子と特定の形で結合する既知の分子を含む溶液の多数の供給源；
- c) 上記溶液の各々と上記物質とを選択的に混合する混合手段；および
- d) 物質の中での既知の分子と分子構造との間の結合が、混合された溶液内で出現するのを検出する検出器。

【請求項37】 請求項36の装置において、検出器が光学的特性の変化を観察することにより結合を検出するものである。

【請求項38】 請求項36の装置において、検出器が電気的特性の変化を観察することにより結合を検出するものである。

【請求項39】 請求項35の装置において、多数の供給源が該当の毛細管に含まれ、しかも各毛細管は該当の供給源を上記物質の流れに接続するバルブを持つ。

【請求項40】 請求項39の装置において、上記毛細管およびバルブはシリコン中に形成され、且つ1から10ミクロンの範囲の直径を持つ。

【請求項41】 分子構造を合成する為の下記の要件を具備する装置：

- a) テスト部位のアレー；
- b) テスト部位の近傍に配置された化学反応体の供給源；
- c) 該当のテスト部位に付随する電極；および
- d) 上記化学物質を該当のテスト部位に吸引する為に、電圧を該当の電極に印加する手段。

【請求項42】 合成されたプローブとターゲット分子との間のハイブリッド化を増やす為の下記の要件を具備する装置：

- a) 多数の上記プローブを含むテスト部位のアレー；
- b) 上記部位に付随する電極；
- c) 上記部位に与えられたターゲット分子の供給源；および
- d) 上記ターゲット分子を上記プローブに吸引する為に、該当の電極に電圧を印加する電圧源。

【請求項43】 請求項11の装置において、テスト部位が、基板の中に形成された凹部を含む。

【請求項44】 請求項43の装置において、凹部が、肌理を持つ表面を以て形成されている。

【請求項4 5】 請求項4 4の装置において、肌理を持つ表面が、波形である。

【請求項4 6】 請求項4 5の装置において、電極の表面も波形である。

【請求項4 7】 請求項1 5の装置において、下部に於ける電極フィンガと上部に於ける電極フィンガとの間の間隔は、ターゲットDNA分子の溶液中の直径のオーダー(order)である。

【請求項4 8】 請求項6の方法において、誘電体特性が誘電率である。

【請求項4 9】 請求項3 7の方法において、電気的特性が誘電率である。

【請求項5 0】 請求項1の方法において、試料物質が固体である。

【請求項5 1】 請求項8の装置において、共振構造は伝送ラインであり、且つライン上を伝播する信号の位相又は振幅に於ける変化が検出されるように構成されている。

【請求項5 2】 試料物質の中の分子構造の存在を決定する為の下記の工程を具備する方法：

- a) 特定の分子構造に結合するプローブが形成されているテスト部位のアレーを形成し；
- b) 試料物質をテスト部位に供給し；
- c) テスト部位を通過する放射を発し；および
- d) プローブに結合する分子構造の存在を決定する為に、該当のテスト部位により吸収される放射の差異を検出する。

【請求項5 3】 請求項5 2の方法において、上記差異が、電荷結合素子(CCD)によって形成された検出器のアレーにより検出される。

【請求項5 4】 請求項5 3の方法において、検出器のアレーが、テスト部位のアレーと一体的に形成される。

【請求項5 5】 請求項5 3の方法において、検出器のアレーは、テスト部位のアレーから切り離して形成される。

【請求項5 6】 請求項5 5の方法において、上記検出器のアレーが上記テスト部位のアレーと整合し、且つ放射がテスト部位を通過して検出器アレーに向かう。

【請求項5 7】 請求項5 6の方法において、放射が、光子、又は放射性の素粒子の放射である。

【請求項5 8】 請求項5 2の方法において、放射が、テスト部位の中で、放射性、化学的、熱的、化学発光性又は蛍光性反応により生成される。

【請求項5 9】 請求項5 2の方法において、検出器は、結合反応が生じる際の熱エネルギーを検出する。

【請求項6 0】 請求項1 8の装置において、テスト部位が、プレートに形成された凹部の中に形成された電極を含む。

【請求項6 1】 請求項6 0の装置において、上記凹部の表面が肌理を持つ。

【請求項6 2】 請求項6 1の装置において、肌理が波形を持つ。

【請求項6 3】 請求項6 0の装置において、電極の表面が肌理を持つ。

【請求項6 4】 請求項6 3の装置において、肌理が波形である。

【請求項6 5】 基板の中に形成されたテスト部位へのプローブの取り付けの為の下記の工程を具備する方法：

- a) 基板の中にテスト部位を形成し；
- b) 上記プローブを接着する為の接着材料を上記テスト部位に形成し；および
- c) 上記プローブを上記接着材料に接触させる。

【請求項6 6】 請求項6 5の方法において、不活性化層が接着材料を覆い、且つ不活性化層の一部分が選択的に除去されることにより、プローブと接着材料との間の接触を選ばれた部位に起こす。

【請求項6 7】 請求項6 6の方法において、選択的に除去される部分がレーザ剥離により除去される。

- 【請求項6 8】 基板の中に形成されたテスト部位にプローブを付着する為の下記の工程を具備する方法：
- a) 基板の中にテスト部位を形成し；
- b) プローブをテスト部位に付着させることの出来る接着材料をテスト部位に形成し；
- c) 接着材料の上に保護コーティングを形成し；
- d) 選ばれた部位に於ける保護コーティングを除去する反応を、選ばれた部位に於いて起こさせながら、保護除去剤をコーティングに接触させ；および
- e) 保護を除去された部位にプローブを接触せしめて、プローブを接着材料に接着する。

- 【請求項6 9】 請求項6 8の方法において、プローブが予め合成され且つテスト部位が凹部から成り、接着材料はエポキシであり、保護コーティングはエポキシを加水分解することにより形成され、保護除去剤はアセテートのアルコール溶液であり、且つ反応は予め選ばれた部位に於いて部位を加熱することにより起きる。

- 【請求項7 0】 請求項6 8の方法において、反応は、選ばれたテスト部位を加熱する為にテスト部位に隣接して形成される抵抗に選択的に通電することにより、起きる。

- 【請求項7 1】 請求項7 0の方法において、選ばれないテスト部位は、所望の反応温度以上の温度に維持される。

- 【請求項7 2】 請求項6 8の方法において、上記反応が、選ばれた部位を光を用いて照射することにより起きる。

- 【請求項7 3】 請求項7 2の方法において、上記光線が可視光線又は紫外線であり、且つ光化学反応が起きる。

- 【請求項7 4】 請求項7 2の方法において、上記光線が、テスト部位毎に走査されて反応を引き起こすレーザ

から発している。

【請求項75】請求項72の方法において、上記光線が、テスト部位の局所的な加熱を誘発することにより反応を引き起す。

【請求項76】請求項72の方法において、上記光線は、選ばれた部位に光を投射する光弁により生成される。

【請求項77】請求項27の装置において、光源が、選ばれた部位へ光を投射する光弁である。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、分子構造の存在を検出する為の方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】多くの用途に於いて、試料中の一つ又は複数の分子構造の存在を検出する必要が生まれる。分子レベルの構造は、一般的に細胞、抗体および抗抗体の如きリガンドを含む。リガンドは、特定のレセプターにより確認される分子である。リガンドは、下記に限定されることは無いが、細胞膜レセプター、毒素(toxins)、毒液(venoms)、オリゴ糖、蛋白質、バクテリアおよび単クロナール抗体に対する作用物質ならびに拮抗物質を含むことが出来る。例えば、DNA又はRNA塩基配列(sequence)分析は、遺伝学的および疾病の診断、毒物学テスト、遺伝研究、農業および医薬品の開発に極めて有用である。同様に、細胞および抗体検出は、疾病の診断にとって重要である。

【0003】分子構造検出に対しては、多くの技法が開発されている。DNAおよびRNA塩基配列検出に於いては、オートラジオグラフィーと光学的検出が一般に使用される。オートラジオグラフィーは、³²P又は³⁵Sを用いて実施されている。DNA塩基配列分析では、核酸断片が³²Pにより最終的に標識を与えられる。これらの最終的に標識を与えられた断片は、サイズ別に分離され、次に特定の時間にわたってX線フィルムを感光させる。フィルムの感光量はフィルムの領域に隣接する放射能に直接関係する。

【0004】どのような放射性の標識の使用にも幾つかの短所がある。第一に、長時間に放射性元素を被ばくすることにより、遺伝病、例えば癌を発生するリスクを高める。従って、放射線の被ばく度を抑制するために、放射性マーカ又は標識を用いる際には予防策が実施されねばならない。通常作業者は、放射線の被ばくを連続的に監視する為の装置を着用せねばならない。更に妊婦は、胎児の遺伝学的突然変異を防止する為の措置を補足的に施されねばならない。

【0005】従来の放射性検出方式は、時間的かつ空間的に感度を制限されている。現在放射性標識の使用時の空間的分解能は1mmである。分解能を1mm以下に引き下げるには、ハード及びソフトウェアが追加的に必要

となる。

【0006】オートラジオグラフィックフィルムを用いる検出の感度は、放射性標識を持つ断片がフィルムを感光させる時間の長さに直接関係する。従ってフィルムの感光時間は、検出テスト部位内の放射能レベルによって時間単位から日数単位にまたがることがある。 β スキャナは、ラジオグラフィー中のフィルム感光に必要な時間を大幅に短縮することが出来る。しかし、 β スキャナの使用は、このタイプの検出の為のコストを著しく引き上げるし、本質的に空間的分解能は低い。

【0007】蛍光標識を持つレセプターの光学的検出も、分子結合の検出に使用されてきた。DNA塩基配列分析のために簡単には、塩基用の特殊な蛍光染料が、オリゴヌクレオチドプライマ(oligonucleotide primers)又はDNA重合酵素に伴って用いられる読み終りジデオキシヌクレオチド(dideoxynucleotides)に共有結合される。各染料に対する適切な吸収波長が選ばれて、染色を励起する為に使用される。染料の吸収スペクトルが互いに接近している時には、全ての染料を励起する為の特定の波長が選ばれる。

【0008】特定の光学検出技法においては、二重鎖の核酸を染める染料、例えば臭化エチジウムを使用する。これらの染料の蛍光は、それが二重鎖のDNA又はRNAに結合される時には、結合されぬ染料又は一本鎖DNAに結合された染料の示す蛍光に比較して約20倍の高さを示す。このタイプの染料はハイブリッド形成(hybridization)実験中にハイブリッド化されたDNA(又はRNA)の存在を検出する為に用いられる。従来の光学検出法の使用は塩基配列決定の実験の能率を高められるが、それには大きな短所を伴う。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従って、分子構造を簡単に検出する為の安全で、低コストで、迅速かつ正確な方法と装置の必要性が業界の中に高まっていた。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、予め定められたテスト部位での分子構造の存在を検出する為の方法および装置が提供され、しかもこれは公知の装置に付随した短所および問題を十分に解消し又は防止する。

【0011】本発明の電気的な実施例に於いては、分子構造を持つ物質が多数のテスト部位に用いられ、各テスト部位は既知の分子構造に結合することの出来るプローブをその中に形成されている。電気信号がテスト部位に与えられ、テスト部位の電気的特性は、プローブが付随の分子構造又は付随の分子構造と共に結合(ハイブリッド化)したかを判定する為に検出される。

【0012】テスト部位は、超大規模集積(very large scale integrated)(VLSI)回路法により、半導体チップ若しくはウエハ上又はそれらの中に形成されたモノリシック構造である。これにより、十分に安価で使い捨

ての可能な低成本、小型のテスト装置が出来る。

【0013】本発明の一実施例によれば、テスト部位に形成されたコンデンサの損失の変化を感知し、又はハイブリッド化された分子が存在する時のテスト部位の交流コンダクタンスの変化を感知することにより、ハイブリッド化された分子を検出することが出来る。或は上記に代わり、各テスト部位の2つの電極の間に通電ラインを形成することにより、ハイブリッド化される分子の存在は、テスト部位に於けるハイブリッド化される分子の形成に付随するRF損失を測定することにより検出することが出来る。

【0014】別の実施例に於いては、各テスト部位に微細機械加工を施された共振器が形成され、共振器のハイブリッド化された分子の形成により生じる共振周波数の変化又はQ (Quality Factor) の変化が、何れの部位がハイブリッド化された分子を含むかを調べる為に測定され得る。

【0015】上記に代わる本発明の光学的な実施例では、電荷結合素子 (CCD) アレーが設けられ、CCD アレーの各電極が隣接する適切なテスト部位に整合せしめられる。ハイブリッド化された分子を持つテスト部位の照射光の吸収の増大による光の減衰が、ハイブリッド化された分子を持つ部位を知る為に用いられる。CCD アレーは、それを用いるテスト部位アレーに一体化されることが出来る。上述の代わりに、テスト部位アレーは別個の使い捨ての可能なプレートとすることも出来る。

【0016】各テスト部位内でのプローブはすべて同じであるが、しかしテスト部位毎では異なっている。DNA 又は RNA 塩基配列テストの為の試片は一般にオリゴヌクレオチド鎖を以って形成されている。本発明の別の実施例によれば、プローブ鎖の各々をカスタム化し又は識別できるように、各テスト部位のマイクロアレーの局所的な感作又はオリゴヌクレオチド鎖の局所的な合成の為の光学的直接バーナーニングシステムが用いられる。記載の発明の性格および長所は後述の明細書および添付の図面から更に理解することが出来る。

【0017】

【発明の実施の形態】 I. システムの全容

本発明の好ましい実施例およびその長所は、各種の図面の類似および該当の部分に対しては同じ番号の使用されている図面の図1-4および4A-4Cを参照することにより理解することが出来る。

【0018】図1はRNAおよびDNA塩基配列決定に関連して用いられる本発明の好ましい実施例を示す。下記の如く本発明は細胞検出および抗体検出又はあらゆるハイブリッド化された分子の検出に用いることも出来る。

【0019】シーケンサ10は、X軸上の通電リードX1, X2, X3—XN、Y軸上の通電リードY1, Y2, Y3—YNにより電子的にアドレス可能なテスト

位置12のX-Yアレーを含む。各X-ラインを連続的にアドレスする為のX-論理回路36が検出および確認回路40に結合されている。類似の回路56はY-ラインY1—YNに結合される。アレー10、XおよびY論理回路36, 56ならびに回路40は、コストの兼ね合いによって單一半導体チップにより実施されることが出来る。

【0020】下記に詳述されるテスト部位12は、半導体フォトリソグラフィックプロセッシング技術を用い半導体ウエハに形成される。各テスト部位は多数のプローブ22 (図4を参照) を備えており、且つこれらは既知の分子構造 (以下“ターゲット”と称す) に結合されることが出来る。ターゲットには、例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、細胞、抗体又は抗抗体の如きバイオポリマが含まれることが出来るであろう。RNA又はDNAシーケンサの場合には、合成プローブは、例えばオリゴヌクレオチドを含むことが出来る。特定のテスト部位でのすべてのプローブは同じである。しかし、それぞれのテスト部位12のプローブは、單一アレー10の中で異なった多数のターゲット (又はターゲット分子の中のサブシーケンス) の同時検出の為に、ある既知のシーケンスで異なっている。

【0021】電解溶液18中にターゲットを含む試料物質が、アレー10に注がれる時に、ターゲットは、各テスト部位12に形成された多数の凹部42の中の付随のプローブ22と結合する。充分な結合時間を経た後、アレー10の表面が水洗いされることにより、余剰のターゲット又は他の結合されなかった分子構造が取り除かれる。残りのターゲット構造の大部分は、特定のテスト部位12に於いて、微細加工を施されたアレー10に設定されたプローブに結合する。次に、各テスト部位12は、論理回路36及び56により電子的に点検され、ターゲットが当該テスト部位に結合したか否かが確かめられる。ターゲットを結合した、即ちハイブリッド化した分子を持つテスト部位は、電気的バラメータを変化させている筈であるから、この変化がX及びYリードによりテスト部位に接続された検出回路40により、検出されることが出来る。この様に電子アドレス動作により、特定のターゲット/プローブ結合の検出が、微細加工されたアレー10の中の各テスト部位12に於いて果たされ、これにより洗滌後に残るターゲットの組成を求めることが出来る。

【0022】DNA塩基配列決定の例に対しては、識別回路40は、この回路により検出されたターゲット (核酸) の組成に基づいて、図21に関連して記載された塩基配列分析を実施する。注:回路40は、例えば、ダイナミックランダムアクセスメモリ (DRAM) 又はアクティブマトリクス液晶ディスプレイ (AMLCD) 装置をアドレスする際に用いられる行及び列アドレス技法を用いて、トランジスタスイッチ (図示されていない) に

より、テスト部位に接続されるのが望ましい。

【0023】II. テスト部位

テスト部位12は、好ましくは単結晶シリコン、若しくはガラス、石英、アルミナ等の如き均等物であるウエハ又は基板34上のモノリシック構造として形成されるのが好ましい。最初に、リードRX1, RX2, RX3—RXN及びRY1, RY2, RY3—RYN(図1に示された如き)に接続されたXおよびY抵抗32のオプション抵抗アレーが、基板34上への適切な材質の金属蒸着又はスパッタリングにより形成されることが出来る。リードは、或る一端に於いて、各テスト部位の下に部位するニクロム、タングステン、又はプラチナの如き抵抗性材料を使用した抵抗32に、又他端では、後述されるプローブ合成目的の為に、X-抵抗-論理回路38及びY-抵抗-論理回路58に夫々接続される。

【0024】或は、上記の代わりに、抵抗32は、ドーピングされたポリシリコン、又は、タングステン若しくはタンタル若しくはプラチナのケイ化物又は窒化物又は酸化窒化物を、公知の技法、例えば化学蒸着(CVD)、分子線エピタキシー(MBE)、金属有機CVD(MOCVD)又は類似の半導体プロセスを用いて付着することにより、形成されることが出来る。

【0025】次に、図5A-5Dに示すように、抵抗32並びに抵抗RX及びRYアドレスラインが形成された後、厚い(約5000Å)SiO₂フィルム50が、CVDにより層32上に形成される。そして、Si, N_xの如きマスク材料の約500Åの薄い層28が次に、例えば化学蒸着(CVD)によりSiO₂フィルム50上に形成される(図5A)。注:図5A-5Dに於いては、単一のテスト部位12で占められるウエハ34の断面が示されているに過ぎない。遙かに多くの、即ち約7百万のかかる部位が、単一の3インチシリコンウエハ上に、公知の技術を用いて製作されテストされることが出来ると理解すべきである。

【0026】図5Aの断面図に示された前駆構造は、次に処理されることにより上及び下の掌状を示す電極構造を形成し、その一部の図3IV-IVにおける断面が、図4に詳細に示されている。

【0027】最初に、約2ミクロン幅の開口54がSi, N_x層28の中に、フォトリソグラフィー及び反応性イオンエッティングにより形成される(図5B)。次に、約4000Åの厚みのSiO₂層50が、緩衝処理されたHFの如き酸溶液を用いてエッティングされることにより、陥没54'が形成される(図5C)。

【0028】次に、上および下の電極21及び20が、Ti26の接着層(300Å)の連続的な電子ビーム蒸着に続く2000Åの接触メタライジング(Au)16により、それぞれ形成される。残りのSi, N_xフィルム28の側面エッジは、下側の電極20のフィンガの幅を決める為の精密セルフアライニングマスクとして使用

されることにより、上及び下の電極の間のショートの起らぬ精密な間隔を定めることが出来ることに、留意が必要である。従って、凹部部位は、低い印加電圧でテストされることが出来る。また、電極は、ターゲットDNA A18を持つ水性DNA溶液の体積に比較して、凹部中の比較的大きな容積を占有する(図4を参照)。上下の電極間の間隔は、ターゲットDNA分子の長さ(又は溶液中の直径)のオーダであることが肝要である。従って、ターゲットDNAの電極間スペース中の溶液に対する比は高く、これにより、電気計測中のターゲットDNAの有無に対する感度を最大に高めることが出来る。

【0029】図3及び図5に示された電極フィンガの長さは、約100ミクロンであり、又電極のセットの幅は又約100ミクロンであり、しかも各フィンガは図4に示された如く2ミクロンの幅及び2ミクロンの間隔を持つ。

【0030】相互間に掌状化された設計により、多数の周辺電極と試料体積をウエハの小さい面積の中に収めることが可能となる。その“試料”キャバシタンスの部位に引き込まれるリードにより生じる寄生的キャバシタンスに対する比は、高い値を持つ。

【0031】次に、図6A-6Fの模式的なシーケンス断面図に、テスト部位12Aを作る為の上記に代わるプロセスが、関連して記載されている。注:特記されぬ限り、層の厚みは図5A-5Dに示された値と同じである。SiO₂層50がSi基板34上で成長せしめられる(図6A)。SiO₂フィルムは、エッティングされることにより、2ミクロンの周期的な間隔を互いの間に持つ2ミクロン幅の凹部54のアレーが形成される(図6B)。フォトリソグラフィー及び反応性イオンエッティングが約0.5ミクロンの深さ迄使用されることにより、凹部54が形成される。約2000Åのポリシリコンフィルム51が、例えばCVDにより、SiO₂層50上に形成される(図6C)。凹部の底および表面上のフィルム51の領域は、ポリシリコン51の側壁を残して、反応性イオンエッティング(図6D)により除去される。側壁は、W、Ti又はPtを用いたケイ化物化により、選択的にメタライジング51'される(図6E)。最後に、Ni又はAu電極61がケイ化物側壁51'上に無電解メッキにより形成される(図6F)。

【0032】図6G及び6Hは、夫々図6E及び6Fに代わる実施例である。図6Gに於いてはテスト部位の底は、この場合には波形の形成により肌理を与えることで表面積を増やされる;これに対し図6Hに於いては、電極61及び底壁の両方に波形が形成される。この肌理を与える表面処理により、特定の部位の表面積が増大し、付着するプローブが多くなり従って感度が高まる。

【0033】III. 電子ハイブリッド化検出法
A. 一般的な方法論

図1-4に記載のセンサアレー10は、本発明によれば、各テスト部位12に於けるターゲットDNA鎖の有無を感知する為のゲノセンサとして使用されることが出来る。

【0034】解読テストでは、多数の比較的短いオリゴヌクレオチド鎖（プローブ22）が各テスト部位12に於いて成長せしめられ又設置されるが、その際ストランドの一端は部位の一つ又は以上の表面に取り付けられる。特定の部位に於ける全ての鎖のコード化シーケンスは判明しており、且つ同じであるのに対し、各部位のコード化シーケンスは異なっておりアレーに於いて特有である。未知の（ターゲット）DNAの長い鎖を含む溶液18がチップ上で洗滌される。理想的には、未知のDNAはその独自のコードシーケンスの一部に対する補体を持つ位置に於いて、オリゴヌクレオチド鎖（oligonucleotide strands）22に固く結合するが、他の凹部ではかかる結合は行われない。実際には、結合の弱いターゲットのミスマッチがいくらか起こり得るが、しかし、これらは凹部を、適切なイオン濃度と温度を持つ適切な溶液を用いてリーンすることにより、緩和されることが出来る。従って、リーン後には、アレーの中での多数の凹部は、有意な量の結合又はハイブリッド化されたDNAを含み、その他は水性溶液中に当初のオリゴヌクレオチド鎖を含むに過ぎない。

【0035】凹部は、次に、各部位に於いて電極16及び20を用いることにより、シーケンスを電気的に調べられる。ハイブリッド化されたDNAを持つ部位は、記録される。例えば、ハイブリッド化されたDNAを持つたぬ部位は、かかるDNAを持つものとは異なった電気的性質を持ち、従って記録はされない。水性溶液中のDNA分子の共振周波数では、溶液の複素比誘電率 $\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon''$ の虚数部分 ϵ'' は、DNAを持つたぬ水性溶液に対する値よりもほぼ10から100倍大きい係数となり得る。下記の方法B、C、D及びEは、各部位12に於いて、 ϵ'' に於けるこの差異を測定又は検出するように設計されている。このデータベースから回路40に於けるコンピュータ“平行処理（overlapping）”又は“ニューラルネットワーク”アルゴリズムは、未知のDNAの全コード化シーケンスを再構築する。

【0036】B. 損失係数テスト

図7は結合した（ハイブリッド化した）DNA（曲線B）及び結合せぬDNA（曲線A）に与えた周波数の対数に対して、損失係数をプロットすることにより、DNAが結合するか否かによって損失係数 $D = \epsilon'' / \epsilon'$ が如何に相違するかを示す。注：測定された特定の試料によって図7の曲線は逆になる場合がある。即ち曲線Bが、結合せぬDNAを示すことがある。損失係数に於けるこの差異は、図1-6に於ける如く形成されたテスト部位に於いて、ハイブリッド化されたDNAの有無を知るのに用いられる。各テスト部位に於ける損失係数は、

回路40内のLCRメータの如き公知の計装により測定される。メータは、論理回路36及び56を経由して各部位12に次々と接続される。

【0037】C. 交流コンダクタンステスト

同様に、ハイブリッド化したDNAの有無は、各テスト部位での交流コンダクタンス $G_{ac} = \epsilon'' A / d$ を測定することにより検出することが出来る；ここで、Aは一つの電極の有効面積であり、dは電極間の有効距離である。特定のDNA分子の弛緩周波数（relaxation frequency）では、交流コンダクタンスは、DNAの存在せぬ時のコンダクタンスに比較して100倍以上も高まる。図9は、このテストが如何に実施されるかを模式的に示している。パルス化された又は周波数走査された波形は、各テスト部位12Bの電極21B及び20Bの間に与えられる。プローブ22が各電極上に形成され、ターゲット分子の水性溶液がテスト部位12Bの凹部42Bの中に形成される。ハイブリッド化したDNAの存在は、図10に示された如きDNAの共振周波数に於いて検出される。個別の周波数でのG又は $R = 1 / G$ を測定する為に、LCRメータを用いることが出来る。上記に代わって、図9及び10に関連して考察された如く、Gは周波数の関数として測定されることが出来る。

【0038】D. 伝送損失検出テスト

伝送ライン上の信号損失も、又 ϵ'' を感知することが出来る。各テスト部位に於いて、X及びYライン間に伝送ライン11を挿入することにより、DNAの如きハイブリッド化した分子を電気的に検出することは、各テスト部位12Aに於いて、ライン11に沿って通過する電磁波のRF損失をスカラー測定することにより可能である。ライン11は、ストリップライン（stripline）、マイクロストリップ（microstrip）、ウエーブガイド（waveguide）、コプラナルウエーブガイド（coplanar waveguide）、スロットライン（slotline）又はコアキシャルライン（coaxial line）の超小型のものを含むことが出来る。この方法での感度を最高にする為に、テスト部位の凹部42Aは、図4の凹部よりも幅及び/又は長さを比較的大きくされ、且つ凹部内の伝送ラインの長さは、それを蛇行せしめることにより最大にされる。

【0039】E. パルス及びチャープ（Chirp）検出法

図11に示された如く、周波数走査された或はチャープされた電圧波形Viが、各テスト部位に於いて電極間に印加され、且つ生じた応答波形V。（周波数が増大するか減少するかにより図12又は図13）が解析され、ハイブリッド化したDNA周波数でのピーク値が示されることで、ハイブリッド化したDNAの存在が求められる。周波数走査された波形を用いたハイブリッド化したDNAの弛緩周波数の測定により、ハイブリッド化したDNAの性質に関する補足的な情報、例えば架橋結合したか否かを得ることが出来る。

【0040】F. 微細機械的共振器検出法

この実施例に於いては、図14に示された如き、シリコンウエハ34Cに形成されたテスト部位に、多数の機械的共振構造が形成される。共振構造は、ウエハの平面内のX方向に延びる下側の金属センサ電極20C、及びY方向に延びるタンタルの如き金属又は窒化ケイ素を用いることが好ましい上側の薄膜共振フィルム21を持つ。通常薄膜サイズは、直径又は幅/長さに於いて約100ミクロンである。空気であることが好ましい誘電体ギャップ60が、上下の薄膜21Cと20Cとの間に形成される。

【0041】テスト部位の凹部42Cは薄膜16C上に、又、プローブ22Cは凹部の表面に形成される。ターゲットDNA溶液18Cは、テスト凹部42Cに供給される。上下の電極16Cおよび20Cの間の機械的空洞60が共振器を形成する。この共振器はキロヘルツからマルチメガヘルツの範囲内で共振周波数を持ち、共振線幅は狭い。

【0042】共振器を横切って伝播するRF信号は、ライン幅の狭い特徴的な高Qレスポンスを生じる。Q又は共振周波数への移行は、共振器表面電極薄膜21C上にハイブリッド化した分子が存在することを示す。

【0043】薄膜電極21Cは、化学蒸着法を用い窒化ケイ素の薄膜を以って構成されることが出来るが、この場合に、シリコン対窒素の比は充分コントロールされ、且つ室温迄冷却された時のフィルム張力を調節する為に、昇温はコントロールされることが必要である。薄膜はバターン化されていないシリコンウエハ上に形成され、次に背面からシリコンウインドー(silicon window)をエッチングで作ることにより分離されて独立構造となる。機械的共振器の例及び上記の用途の構造の詳細は、Buser et al. "Silicon Pressure Sensor Based On a Resonating Element" Sensors and Actuators, A, 25-27 (1991) 717-722 及び Prab et al. "Q-Factor and Frequency Shift of Resonating Silicon Diaphragms in Air" Sensors and Actuators A, 25-27 (1991) 671-698 から知ることが出来る。

【0044】H. 表面弹性波又は電磁波検出法

同様のクラスの共振アレー検出器は、例えば表面弹性波(SAW)又は表面電磁波に用いることで、表面波素子により構成されることが出来る。SAW検出器の場合は図23に示される如く、共振構造700は音響変換器702及びSAW反射器704を用いて形成される。波源708からの走査された周波数の波Wは、音響媒体706(出来ればニオブ酸リチウム又は石英結晶)を通して発射される。反射器704は独立した空洞共振を誘発し、且つこの共振は、メータ70に於いて、変換器で消費された電力を計測することにより検出される。テスト部位712は、媒体上に形成される。

【0045】各部位には付随の変換器及び反射器を備えることが出来、或はマルチプレクサ(multiplexer)が

複数基板の上に形成されることにより単独変換器を複数の部位に接続することが出来る。ターゲット/プローブ対を結合された部位は、共振周波数を移行させる。従って、プローブが結合している部位は検出することが可能となる。変換器702は、リチウムニオベート結晶基板706上に蒸着された相互に掌状化したアルミニウム薄膜構造を持つことが出来る。反射器704は、アルミニウム薄膜格子の構造を持つことが出来る。これらの構造をバターン化するには、標準のフォトリソグラフィー及び蒸着を用いることが出来る。

【0046】上記に代わり、テスト部位を通過した後のSAW波の位相は、伝送ラインの中で基板の中に形成された基準伝送ラインに比較され、且つ結合により生じた移相が何れの部位に結合分子があるかを判定する為に用いられる。

【0047】IV. 光学的ハイブリッド化検出法

A. モノリス的に集積化されたCCDイメージ/読み取り

次に、図15の概略断面図によれば、発明の別の実施例が示されているが、しかしこれはテスト凹部の中のハイブリッド化した分子の有無を検出する為に、モノリシックに集積化された電荷結合素子(CCD)センサによる光学的検出を用いる。

【0048】CCDのアレー200は、結像機能を果たす為にシリコンウエハ212上の集積回路として形成される。CCDアレー200は、光子(hv)がハイブリッド化していないテスト部位218A上で跳ね返る時の検出器ゲート電極220の下に形成された電荷を読み取る。

【0049】光の波長(hv)は、ハイブリッド化したDNAの一つの既知の吸収線に合致する如く選ばれる。方法の持つ感度は、ハイブリッド化したDNAの中に選択的に挿入される臭化エチジウムの如き吸収染料を使用することにより高まる。光は、ハイブリッド化していないテスト部位218Aを通過する時には減衰度は比較的小ないが、ハイブリッド化したテスト部位218Bでは結合分子又は染料により減衰する。

【0050】光子は、ハイブリッド化していない壁218Aの下に在る電極220の下のシリコンウエラー212の中に電荷223を誘発する。かかる電荷は、次に公知の方法でCCDアレーから読み取られ、且つ処理されることにより、ハイブリッド化した分子を含むテスト部位が識別される。

【0051】図15のCCDアレーゲノセンサ200は、Siエピタキシャルウエハ/基板212上のSiO₂のフィールド酸化物(field oxide)層214を成長せしめることにより形成される。CCDゲート電極220は、次に酸化物214上で、タンタル又はタンクスチンの金属をスパッタリングすることにより形成される。窒化ケイ素又はガラス、SiO₂又はポリイミドの如き

50

透光材料を使用することの好ましい誘電体又はポリマ層216が、次に電極の上に形成される。次に、凹部230が、ゲート電極220の直上の層216に形成される。凹部は、水性溶液から被ばくすることによるCCD装置の劣化を防止する為に、窒化ケイ素又は酸化アルミニウムの如き薄い保護層(図示されず)により、不活性化される。標準的なリソグラフィー技術により、ゲートと凹部の部位が整合させられる。

【0052】次に、水性テスト溶液224を使用する前に各テスト部位218を個別化する為に、プローブ(図示されず)が、凹部230の中に形成される。

【0053】別の実施例に於いてはターゲット分子は、例えば蛍光染料、放射性同位元素又は化学発光の如き公知の標識付けメカニズムの何れかを用いて標識を与えられる。CCDアレーは、図15に示された如く、エビタキシャルSi基板212、フィールド酸化物214、CCDゲート220、誘電体層216及び凹部230を用いて形成される。

【0054】テスト領域には、夫々独特なプローブ(図示されず)及び標識タグを持つターゲットを含むテスト溶液224を備える。ターゲットは、蛍光性、化学発光性又は放射性の材料によりタグを施すことが出来る。ハイブリッド化してタグを備えたDNAを含むテスト部位は放射線を発し、且つこれは、該当のCCDゲート220の下の領域内に電荷の集まるこにより、検出することが出来る。

【0055】標識を持つターゲットの実施例では、アルミニウムにより形成されることの出来るフィルタ250又はタンクステン金属ゲート又は誘電体複数層干渉フィルタが、凹部230及び金属電極220の間の誘電体層に形成されるのが望ましい。フィルタ250は励起放射線(hv)又は α 、 β 、 γ 粒子を遮断し、且つ2次放出240を通過せしめる構造を持つ。2次放出は、励起により刺激された電子の如き粒子又は光である。化学発光アプローチは、化学エネルギーの電磁放射への変換を使用する。好ましい物質は安定化された1,2-ジオックスエタン(dioxetanes)である。他の化学発光様式とは異なり、酵素を触媒とする1,2-ジオックスエタン誘導体は、時間単位から日数単位の期間にわたり続くことのある光線信号を発することがある。放射される光の波長は477nmの近傍であり、放射はpHをコントロールすることによりコントロールされることが出来る。477nmでは用いられるべきCCDの量子効率は約13%に過ぎない;従ってケミルミネッセント信号は増幅されねばならぬ場合である。増幅の方法には、水溶巨大分子(例えば牛血清アルブミン)を加えて化学発光信号を増幅する手段が含まれる。

【0056】1,2-ジオックスエタンを用いることに対する利点は数多い。放射線を被ばくせぬことの外に、この方法は実施が比較的簡単である(試薬および機器が

高価ではない)。最後にこの方法のバックグラウンドノイズレベルは低く、且つ可動範囲は広い。

【0057】上記に代わる図16に示された如き2ビース方式に於いては、プローブ部位アレー200'は、例えは10ミルの厚みのバイレックス(登録商標)プレート270の如き別個の薄い透明基板上に形成されている。この別個のプレートには、別個のプローブプレートを別個のCCDアレー260上に自動的に正確に重ねることを可能にする為に、エッチング又はプリントされた格子(図示されていない)の如き精密な位置合わせ機能をマーキングされる。プローブプレートの各アレー部位は、それぞれに特定のプローブにより増感される。

【0058】CCDアレーは、次に図15のプロッキングフィルタ250を用い又は用いることなく製作される。或る実施例に於いてはCCD上にプレートの像を形成する為のレンズを用いることなしに、CCDアレー上の見当合わせされた近接部位にプローブプレートをセットすることにより、分析が行われる。プレートの照射は、図15に関連する上記に於いて考察された実施例の何れの場合とも同様である。別の代案方式は、別個のプローブプレート200'をレンズを用いて、CCDアレー260上に像を結ばせるものである。この方法によれば、2次蛍光が用いられる場合に対しては、プレートとCCDアレーとの間の切り離しを大きくされることが可能であり、又プローブプレートを斜めに励起することにより、励起と蛍光の分離も可能となる。画像形成時の拡大又は縮小が可能である為に、プローブプレート寸法はCCDとは別個に最適化されることが出来る。

【0059】これらの形状の何れに対しても、プローブアレーのモニターに用いられるCCD装置は従来のタイプで、且つ紫外線及び可視スペクトラムに対して感度を発揮するものであり得る。上記に代わるアプローチは、ケイ化プラチナ又はケイ化イリジウム赤外イメージャー(imager)の如き赤外感熱アレー検出器を使用することである。後者を用いる方法によれば、ハイブリッド化又は抗体反応の如き生化学反応中のプローブアレーから発せられる熱を直接モニターすることが可能である。DNAのハイブリッド化及び他の発熱反応は、反応中の熱特性により直接検出することが可能である。物体(例えばハイブリッド化したDNA)の赤外伝達および反射の性質は、物体の分子の赤外線作用による振動及び回転モードに起因する新たな吸収性を持つ新しい分子の結合体の形成のもたらす反応体とは明確に識別される。

【0060】図15及び16の構造では、熱的性質は従来の可視波長又は赤外線検出装置アレーの中の熱により発生するノイズからもモニタリングが可能である。この場合には、生化学反応により生じた熱は薄い構造体の層を通る伝熱作用により伝えられ、且つ電極22の上のノイズバースト(noise burst)として捉えられる。アレーは又、図15の構造に於いて赤外線、可視光線又は紫

外線をフラッド照射される (flood-irradiated) ことも出来る。この場合に、光は、物体の状態 (例えばハイブリッド化したDNA) の持つ吸収帯域内に於いて特定的に選ばれる。非反応状態では、フラッド照射は凹部を通して伝達され、且つフィルター250により反射される。必要な反応の生じた凹部は、フラッド照射波長に於いて吸収性を持つことになる。吸収の行われた後に、フラッド照射は自動的に熱に変換し、且つ反応凹部部位の下の装置の中に伝えられた後に検出される。

【0061】V. プローブの形成

A. 一般事項

アレー10を形成する一つの方法は、アレーの中のテスト部位12に付着するプローブを用いる。希望のターゲットのタイプにより、テスト部位12に各種のプローブを付着させることが出来る。オリゴヌクレオチド、單一若しくは二重鎖のDNA又はRNA、抗体又は抗原-抗体複合体、腫瘍細胞又はこの分野の熟練者により知られている他のテストプローブを使用することが出来る。プローブは、テスト部位に、凹部42の表面上の固体支持基板に固定されることによりテスト部位に取り付けられるか、又は、図4に於ける如く、電極16又は20に直接取り付けられる。凹部42の表面を形成するのに用いられることが出来る固体支持基板は、ガラス、ポリスチレン、ポリイミド、二酸化ケイ素および窒化ケイ素の如き有機又は無機の基板を含む。

【0062】固体支持基板は、選ばれたプローブとの間に共有リンクエージ (covalent linkages) を形成させることの出来る表面化学性能を作り出す機能を与えられねばならない。一例を挙げれば、ガラス支持体はエポキシシランとの反応を通じてエポキシ基による機能を与えられることが出来る。支持体上のエポキシ基は5'-アミノ-誘導体化されたオリゴヌクレオチドプローブと反応することにより、本明細書に参照されている Parkam 及びLoudon, BBRC1:1-6 (1978) に記載された如き2次アミンリンクエージを形成する。この共有リンクエージの形成により、プローブ26は希望のアレーの中の支持面に付着する。機能化されたポリスチレン表面の例には、Kremsky, et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15: 28 91-2909に記載された如き、ヒドラジドにより活性化されたポリスチレンに接合された5'アルデヒドまたはカルボン酸誘導体、並びに Lund, et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16: 10861-10880に記載されているが如き、ジアゾ化により活性化されたポリスチレンに接合された5'アミノ誘導体、およびアミノ-機能化されたポリスチレンに接合された5'磷酸塩誘導体がある。但し上記の文献は参考されることによりこの文献の一部を構成するものである。

【0063】プローブを電極に直接取り付けるには、電極表面が、プローブとの結合を形成することの出来る材料を用いて製作されねばならない。プローブを直接取り

付けることを可能にする為に、電極の表面に使用するとの出来る材料には、金、酸化ニオブ、酸化イリジウム、プラチナ、チタン、タンタル、タングステンおよび他の金属の如き導電性金属材料が含まれる。これらの導電金属は、Whitesides et al. (1990) Langmuir 6:87-96および Hickman et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:1128-1132に記載されているが如きプローブに用いられている有機チオール基とのリンクエージにより、プレート面上に直接安定した結合部を形成することが出来る、

10 但し、上記の文献は参考されることによりこの明細書の一部を構成するものである。一例として5'端又は3'端にチオール基による標識を持つ合成DNAプローブは、プレートの中で金の如き金属と安定した結合を形成することにより、直接取り付けられたプローブのアレーを作り出す。

【0064】B. アレーの感作 (sensitization)

各テスト部位のプローブは、既知の分子又は細胞ターゲットに対して特定的に結合することが出来ねばならない。プローブはチップ外で形成 (合成) され、且つ各テスト部位へマイクロピペット (micropipettes) のロボット操作により挿入することが出来る。この実施例では、プローブは、テスト部位の金、SiO₂又は他の材料に上述の如き化学的リンク機能によりリンクされる。この方法は低密度プローブアレー (センチ当り約100未満) を作るのには充分である。

【0065】上記に代わる方法として、プローブは各テスト部位に於いて合成されることが出来る。この方法は、試片合成の鍵を握る段階が温度に依存する事実を利用するものである。部位を選択する形で表面の温度を高めることにより、プローブは化学的にアレー内の特定のテスト部位に導くことが出来る。このアプローチは、図17の部分概略図に示されている。

【0066】この実施例の例として、テスト部位412のアレー400が、以前に図1-4に示された如く形成される。このアプローチの実施例に於いて、プローブは利用し得るSiO₂表面上で合成される。プローブの合成を始めるには、リンク (linker) が最初に表面に取り付けられる。リンクの取り付けには、テスト部位はエポキシシラン (epoxysilant) (液A) に浸漬されるが、この液はエポキシを表面に共有的にリンクする。エポキシは次に加水分解され、更に塩化トリチルでブロックされる (blocked) ことにより、利用可能な一次水酸基 (hydroxyl) を保護する。

【0067】プローブ合成を始める為にアレーは、次に、保護剤を除去する溶液、通常ジクロロアセテートをアルコールで希釈したものの中に浸漬される。レーザ416から発射されるレーザビーム414が、次に、アレーを横切る形でガルバノメータ走査システム418により機械的に走査される。レーザの目的は、選ばれたテスト部位での表面を加熱することにある。ビームの作用

は、保護機能を解除することの必要なテスト部位412のみを照射する如くプログラミングされている論理およびスイッチング回路420によりコントロールされる。照射後保護除去剤が取り除かれることにより、照射された部位にはOH基が露出する。自由OH基を持つテスト部位は、核酸塩基を加えるのに用いることが出来るようになる。

【0068】DNAプローブ合成はこの時アレー上で行うことが出来る。この為にはフォスフォールアミダイト(phosphoramidite)、フォスフォトリエステル(phosphotriester)又はハイドロジエンフォスフォネート(hydrogen phosphonate)法の如き既知の化学法が何れも利用可能である。チップは活性化され、ベースを備えた前駆体の一つ、例えばアデノシン(A)を含む溶液に浸漬され、且つこれにより、先行のステップで照射されたテスト部位はAにリンクされる。

【0069】オリゴヌクレオチド合成に一般に用いられた如き標準リン酸ジエステル法によれば、チップは保護剤除去剤に再浸漬され、次に再び照射される。例えばグアノシン(G)が付着するときテスト部位が照射されると仮定する。照射後に活性化したGが加わり第2フォスフォジエステル結合の合成プロセスが反復される。

【0070】既定のサイクルが、次にチミジンに対し、次にシトシンに対して、チップ上で行われる。上記を総合すれば核酸塩基は4つ存在する為にプローブアレーを1核酸サブユニットだけ延長するには、4サイクルの照射が必要となる。10ベースの長さのプローブのアレーを合成するには40サイクルが必要となる。

【0071】レーザによる反応の開始は、局所的な加熱又は光化学により起きる。光化学的合成を開始する為に、好ましい実施例は、可視波長又はUVアルゴンイオンレーザとガルバノメータ走査システムの組み合わせを使用する。合成反応は温度に対して著しく敏感であることが知られているから、上記に代わる案として、アルゴンレーザ又は赤外レーザを使用することにより、アレー部位の局所加熱法による合成を開始することが出来る。

【0072】上記の方法は、熱を利用してアドレスすることの出来る保護剤除去の原理に基づき、固体サポート上のペプチド又は他のポリマープローブの合成にも用いることが出来る。例えば、ペプチド合成の場合には選択された部位でのペプチド合成は通常希釈されたベース(base)でのf-moc保護基を熱により除去し、次にキャッピング(capping)およびペプチド合成の通常の他の工程を用いて実施される。

【0073】上記の代わり、“接着剤”層がテスト部位に対し走査されたレーザ照射により局所的に活性化され(図26A-D)(又は活性を停止され)、又は局所的に施される(図25A-D)。この実施例に於いては、希望のアレーの部位の接着性を光化学的又は熱的に変化させる為に、紫外線、可視光線又は赤外レーザが用いら

れる。例えば、タイプAのプローブ溶液は、アレー上で洗滌されることにより、希望の部位でのタイプAの試片の局所的な接着が実現される。タイプAプローブ溶液は、次に、システムから急速に洗い流され、新たなアレー部位に第2のレーザ照射が施され、且つタイプBプローブ溶液がタイプBプローブを接着する為に用いられる。このプロセスは、アレー全体を感作する為に反復される。

【0074】アレーの感作は、ガルバノメータ若しくは回転ミラーの如き走査光学装置、又はコンピュータコントロールされたX-Yステージを持つ固定レーザビームを用いる、CWアルゴンイオン又はCW Nd:YAGレーザを利用することにより実施されることが出来る。“接着剤”層での活性化又は活性停止は、パルス化Nd:YAGレーザ又はエクシマーレーザの如き短パルス化されたレーザを用いて実施されるのが望ましい。“保護除去”の為に単純に“接着剤”層902をカバーし、次に“接着剤”的上に施された不活性化された材料904を剥離することにより、“接着剤”を露出せしめるのは優れたアプローチである(図26A-Dを参照)。

“接着剤”層の例は、エポキシ、チオール又は親水性の、例えば水和された表面である。不活性化材料は、フッ素を端末に持つフルオカーボン又は誘導体又はヘキサメチルジシリザン(hexamethyldisilizane)の如き疎水性の材料を用いることが出来る。

【0075】図25A-Dおよび26A-Dは、“接着剤”アプローチを用いたプローブ形成の2つの代案を示している。更にその各々は、テスト部位を活性化するのに2つの選択可能な方法を示す。一つの方法は、テスト部位のFに埋め込まれたヒーターエレメント906の如きプログラム可能なエレメントを使用することによりテスト部位に熱反応を誘発し、これによりプローブが接着すべき接着剤層920を作り又はデポジットする。完全に合成されたプローブ912は部位の上で洗滌され、且つ露出した接着剤層部位920に接着する、図25D。次の別の部位が形成されるか又は露出せしめられ、且つ別のプローブが付着する。上記に代わり、図25Bに於けるが如き外部照射が接着剤層を形成するのに用いられ、或は図26B及びCに於けるが如く不活性化層904を剥離し、且つ接着剤層902を露出せしめる為にも外部照射が用いられる。

【0076】走査されたレーザビームの使用に加え、上記に代わる“直接バターニング”法が、レーザ又は強力ランプにより照射されるスイッチングの可能な、ミラーアレー又は液晶ディスプレイの如き、再構築可能な(reconfigurable)“光弁”415(図17の点線により示された)を持つ定常照明ビームを用いて、実施することが出来る。照明された“光弁”は、センサーアレー400上にレンズシステム(図示されず)により結像される。“光弁”に於けるピクセルエレメント(pixel elem

ents) は、電子的にスイッチオン又はスイッチオフされることにより、センサアレーの中で感作されるべき領域を選ぶことが出来る。この目的の為の優れた“光弁”装置は J. A. Neff et al.により発表されている (Proc. of the IEEE, Vol. 78, No. 5, May 1990)。

【0077】プローブのチップ上での合成の為の別のアプローチは、参照されることによりこの明細書の一部を構成する1990年12月13日のInternational Publication Dateを持つAffymax Technologiesに譲渡された Pirrung et al.による、“Very Large Scale Immobilized Peptide Synthesis”の標題を持つPCT International Publication Number WO 90/15070に記載されている。このアプローチは、部位や表面での熱化学反応よりも、レーザによる保護基の光化学反応に基づくものである。

【0078】プローブ鎖を合成する為の別の方法は、隣接部位を余り加熱することなく予め定められたアレーテスト部位を局所的に加熱する為に、図1及び4に関連して記載されている埋め込み抵抗32を用いる。この方法によれば、選ばれた抵抗の間の電圧の印加に応じて、短いオリゴスクレオチド鎖の如きプローブの熱により誘発される合成がその場所で行われる。上記に代わり、反応が必要な凹部に隣接するものを除き、全ての抵抗に大電流が流されることが出来る。この方法では、非合成凹部は希望の合成温度以上の温度に保たれ、これによりこれらの凹部で合成反応の起きることが阻止される。

【0079】発明の電気的にアドレスすることの可能なテスト部位アレーは、特定の凹部又はウエルの行又は列の電極に電圧を印加することにより、この凹部の中で合成反応を電子的に誘発し又は触媒作用を働かせることが可能となる。

【0080】電圧は、凹部の近傍に在る溶液から化学反応物を引き出し及び／又は凹部の中の特定の化学反応に對して触媒作用を働かせる為に使用されることが出来る。

【0081】更に、ターゲット分子構造と完成したプローブとの間のハイブリット化は、ターゲット溶液がテスト部位に施された直後の電極への電圧の印加により、増加されることが出来る。電圧の印加なしでは、ターゲット分子構造は溶液を通ってプローブ迄拡散せねばならない。かかる拡散プロセスの非効率性の故に、有意なハイブリッド化を起こすには1.5から2時間を必要とするが、この時でもハイブリッド化せぬプローブは可成りの数にのぼる。電圧は、電荷を持つターゲット構造を電極の傍の又は電極に付着したプローブに迄直接引き付けることが出来、この結果、ハイブリッド化の率、及び特定の実験に於いて都合よく作り出すことの出来るターゲット／プローブハイブリッド化の総数は増加することになる。その後、ハイブリッド化せぬターゲット分子およびミスマッチターゲット分子の洗滌(除去)には、逆バイアスをかけられた電圧を印加することが出来る。

【0082】この技法は、各テスト部位に電極を備えている図1から9の電子ゲノセンサに適用し得るのみならず、各テスト部位の中若しくは下に在る電極を用いるか又はこの目的で各テスト部位は一つ若しくは2つ以上の追加電極を製作することにより、微小機械的な共振器およびCCDをベースとするアプローチの両者も用いることが可能である。

【0083】上記の代わりに、個別の凹部に印加される電圧により、最後に記載の上記の方法と同様に、“接着剤”層又は接着剤不活性化層を蒸発させるに充分な電流サーチがウエル構造を通過させられることが出来る。アレーの感作は、電気ヒューズのアレーの電子プログラミングに似ている。

【0084】次に、図18及び19に従って、テスト部位に於いて、独特のゲノセンサプローブをその場所で合成する為の微小流体システムが記載される。この実施例に於いては、試薬給源352はチャネルL1, L2——LNを介して、適切な基板341に形成された該当のマイクロチャネルバルブV1, V2——VNに個別に流体的に接合される。バルブV1—VNは、溶液がミニホールドラインL4に流れることを可能にする。微小流体ぜん動ポンプP1は、溶液を窒化ケイ素又は二酸化ケイ素の如きレーザ放射透過フィルム344及び343に包まれているアレー10'に送り込む。

【0085】レーザ416'からの放射は、上述の走査又は結像法に従って、基板341の中に形成される個別のテスト部位12'に選択的に集中せしめられる。テスト部位のレーザ走査は、入力溶液がバルブV1—VNを用いて迅速に切り替えられる時に、個別の部位の局所的な活性化を誘発する。

【0086】流体システム全体及びアレーは、半導体の单一チップ又はSi、ガラス、Al2O3等の誘電体材料上に形成されることが出来る。チャネル342は、基板341の中に、従来のフォトリソグラフィー及びエッティング液を用い、又は微細機械加工技術により、エッティングされる。テスト部位12'のアレー10'は、図1-6に関連して記載された如く基板の中に形成される。

【0087】図19に示された微小流体フローシステムは、下記の如く形成されることが出来る。フォトレジスト材料が、例えばバイレックス(登録商標)ガラスを以って構成された基板341上に、スピンドルコートされる。微小チャネル構造は、次に、フォトレジストの中に標準的なフォソリトグラフィーを用いてバターン化され、且つチャネル構造343及び342を含むバターンは、緩衝されたHFを用いたエッティングにより基板の中に移される。チタン酸ジルコン酸鉛の如き圧電物質又はPVDFポリマ、及び金属電極から成ることの望ましい薄膜アクチュエータ層344が、次に微小チャネル構造に結合される。感作中にアレー10'は、出来ればエラストマ

一〇ーリング345を用いて微小流体システムに対してシールされる。この分野のスペシャリストには知られている往復運動する薄膜アクチュエータ層は、圧電物質の代わりに形状記憶金属を使用するか又は静電的に変形した不動態材料、例えば電極（図示されず）に印加されたDC電圧により偏向したアルミニウムフィルムをベースとして形成される。

【0088】フローチャネル構造の量産は、上記のフォトリソグラフィー法を用いることにより可能である。或る種のチャネル形状に対しては、塩素雰囲気中のシリコンのエッティング用に開発された如きレーザ微細機械加工法を用いることが可能である。フォトリソグラフィー又は微細機械加工の何れかを用い雌型のモールドを作ることが可能であり、且つこれから例えば熱圧着法により雄型が型取られる。

【0089】VI. 微小流体分子検出

上記に考察されるアレーは、質量並列型板（massively parallel templating）の原理で機能する。或る代案のアプローチが図20に示される。このシステムは、ナノリットル又はピコリットル溶液量を以って作動する拘束の直列的な微小流体検出器である。このシステムは、微細加工された毛細管チャネルのシステム、主チャネルC1に接続されたバルブV1-VN+3、及び上述の如く形成された単列（又は数列の）高感度検出アレー480から成る。未知の分子を含む溶液の定常的であるが低流量の流れが、図18及び19に関して上述された方法を用いて混合される。未知の溶液は、流体の流れの中の給源S1-SN+3からの既知の独特のオリゴヌクレオチド鎖のバッチ（batches）を含む溶液と同様に小量で、連続的に混合される。検出器480は、流れを監視することにより、何れのオリゴヌクレオチドバッチがハイブリッド化反応に於ける未知の分子と反応したかを調べる。ハイブリッド化は、溶液が検出器の前を流れる時に、溶液の電気的又は光学的な性質に於ける特性の移行又は識別の可能なスペクトル特性を観察することにより、電気的又は光学的に上述の如く検出されることがある。

【0090】図20、18及び19のこのシステムの重要な特徴は、バッチが拡散により誘発されるスミアリング（smearing）を生じることなく流れーを連続的に処理することを可能にする、無効流量が極めて小さく流体の流れの速い広汎なチャネル又は毛細管ネットワークが使用されることである。この構想は、大型のチューブとバルブを使用する際には非実用的であり、従ってかかるネットワークを最小化することが好ましい。最近の実験に於いて、我々は図19に関連する上記の方法を用い、シ

リコン中に1から10μm径のフローチャネルのレーザによる微小化学ミリング（microchemical milling）の可能性を実証した。Siウェハ上に存在する微小機械加工されたネットワークの廉価な型取りは、射出成型又はエンボス加工により果たされることが出来よう。バルブは一体化された電気アクチュエータを必要とするが、これは装置上の又は装置外のマイクロプロセッサによりスイッチングされることが出来る。

【0091】VII. プローブ結合メカニズム

10 合成DNAプローブを使用するシーケンシングの為の結合メカニズムの模式的図解が、図21に示されている。ハイブリッド化によるシーケンシング（SbH）は、DNAから成る窒素性の塩基を解読する確認機構を提供する為の、自然塩基対合特性を開発する新しいシーケンシングアプローチである。図21には、DNA試料の部分塩基配列802が右に示されている。試料DNAに於ける4つのベース804は、表面に付着する短い合成DNA片806を用いて特定的に配合される。サポートに結合しているDNA“プローブ”は、試料“ターゲット”20 DNA802の完全に補完的な塩基配列の出現に対する確認エレメントとして作用する。

【0092】DNA試料ターゲットの塩基配列を解読する為に、大型のDNAプローブのセットを使用する構想が下記に説明されている。例IはDNA試料の塩基配列の一部を示し、且つこれは分析の前に加熱することにより、一本鎖の形に変換されている。特定のプローブ長さ（例えば、65, 536すべての8-塩基プローブ）に対するあらゆる可能な塩基配列をあらわす一セットの合成DNAプローブに試料DNAを露出せしめ、次に何れのプローブがターゲットDNAに特定的に結合したかを検出することにより、DNA試料に含まれるオリゴヌクレオチド配列の完全リストを作ることが出来る。例II（下記）に示されたケースでは、リストされた8merプローブのみが、試料DNA配列に従ってハイブリッド化する。次に、オリゴヌクレオチドの内容からターゲットDNAの完全な配列を作り出すのに、オーバーラッピングアルゴリズムが用いられる。

【0093】

【化1】

【例1】

40

未知の一本鎖DNA（ターゲット）

ATCGCTTACGGTAATC

【0094】

【化2】

ハイブリッド化した合成遺伝プローブ

```

T A G C G A A T
A G C G A A T G
G C G A A T G C
C G A A T G C C
G A A T G C C A
A A T G C C A T
A T G C C A T T
T G C C A T T A
G C C A T T A C

```

【0095】VIII. 応用法

DNAおよびRNA検出に関する本発明の商用的利用には、遺伝研究、遺伝および感染症の診断、毒物テスト、個体の識別、農業上の識別、増殖の最適化、汚染物の検出による品質保証並びに突然変異の検出による職場での危険性のスクリーニング (screening) が含まれる。

【0096】現在ヒトには4,000から5,000の遺伝疾患があると推定され、且つこれらの場合には、遺伝子に於ける突然変異性の変化が遺伝子生成物を破壊又は阻止することにより、重大な医学的な状態に到らしめている。影響を蒙る遺伝子および蛋白質 (遺伝子の生成物) は、今のところヒトの遺伝疾患の一部に対して確認されているに過ぎないが、その数は着実に増えつつある。突然変異が疾患に付随していることが確認されたヒト遺伝疾患の幾つかの例には、臍嚢胞性纖維症、フェニールケトン尿症、アルツハイマー症、癌、デュシェーヌ筋ジストロフィー及び家族性高コレステロール血症が含まれる。或る症例において、疾患には一つ又は極めて僅かな特定の突然変異が関係するが、全部でなくとも多くの遺伝疾患は、影響を蒙った遺伝子に関連して出現する多数の突然変異のすべてに起因していることが明らかになりつつある。

【0097】前者の場合には、欠陥のある遺伝子の存在が、単純なDNAハイブリッド化検出テストの使用により検出されることが可能であり、このテストでは、合成DNAプローブは、ワイルドタイプ (wild type) 及び突然変異性のDNAシーケンスを識別する為に用いられる。後者のケースでは、疾患に付随することのある突然変異に対する全ての遺伝子を調査する為に、DNAシーケンシングは大きな負担となる。

【0098】疾患に関連する遺伝子内の突然変異を検出することの重要性は、劣性遺伝疾患のキャリアをスクリーニングすることによって遺伝的カウンセリングや子供を作るべきでないことの告知ができるようになること及び治療的措置を可能にすることのある出生前診断を行う為の手段の両者に在る。オリゴヌクレオチドプローブを

適切に選択することにより、シーケンサ10は、ターゲット遺伝子内のすべての突然変異を迅速に検出する新しいターゲット遺伝子DNAシーケンシング手順に到らしめることにより、遺伝疾患の診断及び特に各種の突然変異が欠陥を生ぜしめることのある時のキャリアの特定を容易にする。多分より重要であるのは、或るターゲット遺伝子内の何れの突然変異が或る疾患に実際に関与しているか、及び何れの突然変異が無害の多形現象を示すか、を発見することを目的とした集団検診に役立つことを保障し得る迅速で高能率な手順である。この情報は、突然発生する変異および治療法の開発を容易にする、価値ある構造-機能の関係の特定の探知の為のテクノロジーの簡単化に役立つことが期待される。

【0099】本発明は遺伝疾患に限定されることはない; この発明は、感染病原体の迅速かつ高能率の識別に30対して使用されることが出来る。ウイルス又は微生物の各種又は株は、アレー10の中でのハイブリッド化の独特的の診断パターンをもたらすことが予測されている。

【0100】上述の遺伝子をターゲットとする突然変異の検出は、環境研究上、例えば細胞が化学物質を侵襲的に被ばくすることにより誘発する突然変異の検出の為の重要な用途を持つ。同様に、本発明は、職場に於いて化学物質又は放射線を被ばくすることのある従業員の個人毎の検査に用いられることが出来る (例えば循環リンパ球集団の中の突然変異に対する定期スクリーニングによる)。このテクノロジーの重要な用途は、特定の遺伝子の大規模な及びポイント的な突然変異の特性化により、突然変異誘発性の危険の予測的モデル、例えばヒボキサンチングアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase) (H P R T) に対するものを開発することである。

【0101】高密度アレーは、ゲノムシーケンシングに於ける多数の用途を見出しう、且つヒトゲノムに於ける30億の塩基対のすべての配列を決定する現在のヒューマンゲノムプロジェクト (H G P) の作業に於いて、重

要な役割を果たすと考えられる。しかし、より重要なことは迅速で高能率のシーケンシングテクノロジーが利用し得ることにより生じる、新たなヒューマンゲノムプロジェクトである。多数の個人から得られたヒトゲノムの反復的DNAシーケンス分析を実施する必要性は、複合多重遺伝子疾患状態（complex multi-gene disease conditions）及び他の遺伝傾向を特徴化する為に存在することになる。この作業は、現在のHGPが完了した後も長く続き、バイオメディカルサイエンスに革命的な進歩をもたらすことになる。

【0102】本発明のもう一つの有望視される用途は、“DNAの分類（typing）”であり、この場合には、個人間のDNAシーケンスの間の差異が分析される。或る人のDNAに於ける大量の多形性のマーカを同時にスクリーニングする為の本発明のシーケンサは、時間と労作を要する現在のrestriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析技術に比して大きな利点を持つ。DNA分類は犯罪科学及び実父確定検査に於いて重要な役割を果たすことがある。更に兵役中のすべての人々を*

【表III】

プローブタイプ

<u>ターゲット</u>	<u>プローブ</u>
DNA、RNA	オリゴヌクレオチド
抗体	抗原（ペプチド）、抗抗体
細胞	抗体、蛋白
ホルモンレセプター	ホルモン
Aviden	ビオチン
免疫グロブリン	プロテインA
酵素	酵素ファクタ（Enzyme Factor）
レクチン	特定の炭水化物

【0106】検出装置がプローブとしてペプチド又は他の抗原を用いる時には、図22に示された如き生物体液中の抗体を検出することが利用可能である。

【0107】この実施例に於いては、ペプチド抗原（プローブ22）は、一端にシランを、又、多端にエポキシ又は他のペプチド特有の基を持つものの如き双機能クロスリンク（bifunctional crosslinker）を用いて、テスト凹部12A（図6Hに示された如きものに類似の）の底に於いてSiO₂50に付着せしめられる。

【0108】処理された表面は、次に、抗体を含む液18を用いて孵育される（ターゲットT）。抗体は巨大分子（クラスにより150,000から950,000分子量）である為に、結果的に得られるターゲット/プローブ結合はテスト凹部12Aの誘電率に大きな変化をもたらす。効果の大きさは、ターゲット抗体に特定の第2抗体を用いてターゲット/プローブ複合体を処理することにより、追

* DNA分類することに専念がある。

【0103】価値ある新しい植物および家畜が遺伝子のエンジニアリングにより開発されるので、農業上の産物の供給源および所有権を確認する為に、DNA分類する必要性が生まれるであろう。ヒト、植物及び動物に於けるゲノムシーケンシングから得られるシーケンス情報は、医薬品を開発し、且つ改善された穀物および家畜を創り出す為の遺伝子エンジニアリング技術の応用を増やすことになる。例には、疾病および苛酷な気候に対する耐性のより高い株、並びに大きな収量又は高い栄養価を持つ穀物が含まれる。

【0104】本発明は、DNA又はRNA以外の分子構造、例えば細胞及び抗体の如きターゲットの検出に関連して使用されることが出来る。表IIIは、ターゲットとして使用される他の分子構造に対する使用可能なプローブのタイプを示す。但し、記載のプローブタイプに限定されることを意味するものではない。

【0105】

【表1】

加的に增幅されることが出来、これにより非常に大きな複合体を作り出すことが出来る。

【0109】抗体/抗原および抗体間相互作用の親和性並びに選択性は公知であり、且つ既存のクラスのバイオテクノロジーに対する基礎である（ELISA分析法、40免疫組織化学及びその他）。この明細書に記載されたテクノロジーは、新しいマイクロエレクトロニック検出方式に於ける公知の結合相互作用を用いる。

【0110】上記の方法の商用的用途は、血液試料又は他の生物体液中に於いて、何百何千の異なった抗体又は他の蛋白の存在を同時に検出するものである。これは、血液型の決定、エイズの如きウイルス感染の検出、又は癌の診断に特に有用である。これは又、研究用の手段として極めて有用である。これは、ELISA分析法及び抗体/抗原の相互作用を検出する為の他の生化学的方法に代わり又はその用途を拡大する。

【0111】検出器がプローブとしてペプチド、抗体又は細胞に結合する他の分子を用いる時には、検出器は、生物体液中の特定の細胞のタイプを検出するのに用いることが出来る。

【0112】この実施例に於いては、プローブ22は抗体、蛋白又は脂肪表面に結合することの知られている他の分子を用いる。この場合のターゲットTは、プローブ22を用いた結合の為のレセプターTを持つ無傷の細胞である。

【0113】細胞を含む流体溶液が検出器に加えられる。ターゲット/プローブ結合相互作用の後に、結合により細胞に接合された検出器凹部が出現する。細胞は電流を通すことはなく低周波誘電性の緩和 (dielectric relaxation) を示すので、細胞の結合は凹部の中の絶対導電性 (absolute conduction) に於ける変化 (Coulterの原理の変形) によるか又は低周波誘電性の緩和効果の誘発により検出されることが出来る。

【0114】上記の方法の商用上の用途は、細胞表面の性質の変化した細胞、特に血中又は他の体液の中の細胞の存在を検出することにある。固体組織からの細胞は、標準組織分散法を用いた後に分析されることが出来るであろう。かかる検出器は、科学的研究手段としてと同様にウイルス感染の診断及び癌の診断に有用である。これは蛍光顕微鏡検査及び蛍光励起細胞分離捕集法に代わり得るものである。

【0115】IX. 効果

現在の微細加工技術により、均一な密度及び物性を示すマルチメガビットメモリを廉価に作り出すことが可能である。従って、数百万にのぼることの考えられる個別の生物学的テスト凹部を含むアレーが、標準的な電子機器に比較して同等のコストで小型化されることが出来る。例えば、百万の生物学的テスト部位を含むアレーが、1 cm × 1 cm のサイズに収められることが出来る。更にかかる方法で製作される装置の均一な電気的特性は、多くの他のアプローチよりも検出感度を遥かに高める。

【0116】上述の微細加工された電子検出器及び光吸収CCD検出器の一つの重要な利点は、検出法がターゲット/プローブの分子結合を直接検出することを可能にする点に在る。従って、毒性のある蛍光性、放射性又は化学的マーカが、ターゲット又はプローブに取り付けられる必要はない。寧ろ検出には、適切な電気信号又は周波数シフトが捉えられるだけで良い。この様な信号又はシフトは、オリゴヌクレオチドに対するDNA及びRNAの如き多くのターゲット/プローブには当然起きる。しかし、電子検出器の中での信号又はシフトが、結合後に弱まるか又は存在しなくなる時には、電荷を持つ分子マーカがターゲットに取り付けられることが出来る。更に電子検出器での検出は、微細加工されたアレーが腐蝕性の生物学的溶液に接触する時には時間的にあいまいとなることのある強度の特性の変化とは異なり、周波数特

性の変化により観察される。従って装置はクリーニングされ、且つその精度に影響を蒙ることなく、何回も繰り返して使用されることが出来る。検出の方法は、電極の或る種の腐蝕に耐えるが、長期にわたって使用するには不活性化層がプレートを被覆する為に使用されることが出来る。

【0117】本発明のもう一つの利点は、検出測定を行う為にテスト部位を調べるのに用いられる電子回路が、生物学的アレーを含むウエハ上に直接加工されることが出来る事である。スイッチマトリックス、信号処理回路及びエネルギー給源は、アレー上の検出の迅速化を容易にする為に、同じチップ上に設けられることが出来る。従って、ウエハ上の能動回路の装着により、実験コストは大幅に減少することも考えられる。

【0118】テスト部位12に取り付けられたプローブ22の密度は、感度を直接決定する。マイクロエレクトロニック法では、一本鎖DNA断片の短い (ハイブリッド化の行われていない) ものと長い (ハイブリッド化の行われた) もとの間には、係数において10倍の差異がある。一方、染料挿入光学法の場合は、係数において3倍の差異しかない。

【0119】大抵の実施例に於いて、放射性フィルムの使用を不用とすることは、テスト時間を減らすことになる。何故ならばフィルムの感光が不要となるからである。試料の製作時間は大幅に短縮される、何故ならば核酸断片には標識を与える必要がないからである。検出法は迅速である；測定は充分な分子結合の完了と同時に行われるからである。更に測定プロセスは、アレーの中の各テスト部位をアクセスする為の極めて迅速な方法を提供する為に、チップ上のマイクロプロセッサコントローラにより自動化されることが出来る。

【0120】これらのタイプの検出装置に用いられるマイクロエレクトロニックテクノロジーは、かかる種類の実験のコストを劇的に引き下げる。メガビットメモリチップ及びメガビクセルCCDイメージングチップを製造する際に用いられる有効な量産技術の使用されることが決め手である。

【0121】本発明及びその利点が詳細に記載されたが、各種の変更、置換及び改変が付隨の請求範囲に定められた発明の精神と範囲を逸脱することなくこの中に加えられることが出来るものと理解される。

【0122】例えば、図1の回路36, 56, 38, 58及び40の如きゲノセンサ (genosensor) アレーの能動回路は、凹部又は同じ基板のアレーとモノリシックに一体化されることが出来る。スイッチマトリックス、アナログテスト回路及び、アナログ又はデジタル (マイクロプロセッサ) コントローラは、同じウエハ上に加工されることにより、電気的テストを実施又は簡便化することが出来る。図24に示された如くTRX1の如きトランジスタは、例えばサンプリングされている時を除き、

各部位を電気的に切り離す為に、該当のテスト部位12に隣接する各基板の中に一体化することが出来る。この為に各行に対してアドレスラインA3を追加することが必要になるが、寄生的キャパシタンス及び使用されぬラインからの偽信号を解消する。これらの好まざる効果が大幅に解消することは、第2のアドレスライン及び部位12のY側に接合されたトランジスタセットにより果たされる。

【0123】広汎な種類の信号処理及びバターン認識機能を実施することの出来るCCD回路（ニューラルネットワークを用いたCCDを含む）が実証された。CCDデータ処理回路とゲノセンサアレーとの一体化は、DNA検出および解読の手段を簡単化し、且つ図15及び16に関連して記載された集積化されたCCDイメージャと共に用できる。

【0124】発明は溶液が使用されるウェットタイプのテストに関して説明された；プローブ及びハイブリッド化されたプローブ/ターゲットの組み合わせが、乾燥した媒質又はゲル中で行われる“乾式”又は“ゲル”アプローチを使用することは全面的に可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】発明の好ましい実施例によるマイクロエレクトロニックセンサアレーの部分透視図である。

【図2】図1の一部の拡大図である。

【図3】図2の電極部分の拡大図である。

【図4】図3の線I-V-I-Vに沿った断面図である。

【図5A】テスト部位を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図5B】テスト部位を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図5C】テスト部位を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図5D】テスト部位を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6A】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6B】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6C】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6D】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6E】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6F】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6G】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図6H】テスト部位の上記に代わる実施例を形成する際の重要な工程を示す処理手順の断面図である。

【図7】結合されたテスト部位（曲線A）及び結合されぬテスト部位（曲線B）に与えた周波数に対して損失係数をプロットした図である。

【図8】蛇行した通電ラインを用いた上記に代わるテスト部位実施例の平面図である。

【図9】 f_1 から f_2 の周波数範囲を持つ印加交流入力電圧 V_1 を用いたテスト部位検出システムの概略図である。

【図10】入力電圧 V_1 に対してテスト部位の交流コンダクタンスをプロットした図である。

【図11】低周波数 f_1 から高周波数 f_2 に掃引される定振幅信号において時間に対して V_1 をプロットした図である。

【図12】図11の入力電圧波形に応答するテスト部位からの感知された出力電圧 V_2 をプロットした図である。

【図13】 f_1 から f_2 に下降する入力波形 V_1 に応答するテスト部位からの感知された出力電圧 V_2 をプロットした図である。

【図14】機械的共振構造を用いて製作されたテスト部位の概略断面図である。

【図15】CCDアレーを下に使用してテスト部位が形成されている、上記に代わる実施例の概略断面図である。

【図16】図15に於ける如くテスト部位は使い捨てのプレートの中に形成され、且つ別個のCCDアレーを伴う場合の概略断面図である。

【図17】テスト部位でのプローブの合成の為のシステムの概略図である。

【図18】適切な場所でプローブを合成する為のマイクロ流体システムの概略図である。

【図19】図18のマイクロ流体システムの概略断面図である。

【図20】マイクロ流体ゲノセンサ実施例の概略図である。

【図21】合成DNAプローブが予め定められたDNAシーケンスに選択的に結合する方法を示す概略図である。

【図22】生物学的媒質中の分子を検出する為に用いられるテスト四部の概略断面図である。

【図23】本発明の表面弹性波を用いた実施例を示す概略図である。

【図24】発明の上記に代わるアドレス実施例の部分概略図である。

【図25A】アレー感作の上記に代わる方法を示す一連の断面図の1つである。

【図25B】アレー感作の上記に代わる方法を示す一連の断面図の1つである。

【図25C】アレー感作の上記に代わる方法を示す一連の断面図の1つである。

50 の断面図の1つである。

【図25D】アレー感作の上記に代わる方法を示す一連の断面図の1つである。

【図26A】上記に代わるアレー感作法を示す、図25A-Dに於ける如き一連の断面図の1つである。

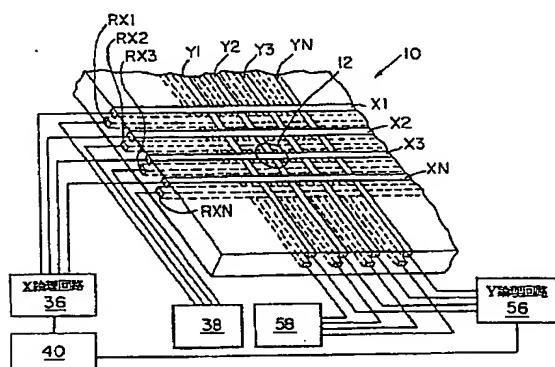
【図26B】上記に代わるアレー感作法を示す、図25* A-Dに於ける如き一連の断面図の1つである。

* A-Dに於ける如き一連の断面図の1つである。

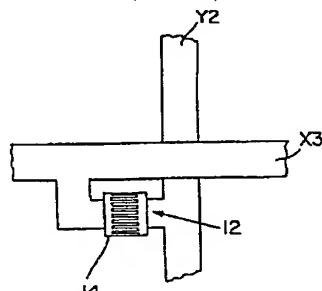
【図26C】上記に代わるアレー感作法を示す、図25A-Dに於ける如き一連の断面図の1つである。

【図26D】上記に代わるアレー感作法を示す、図25A-Dに於ける如き一連の断面図の1つである。

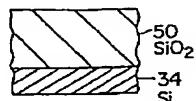
【図1】



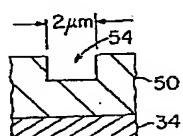
【図2】



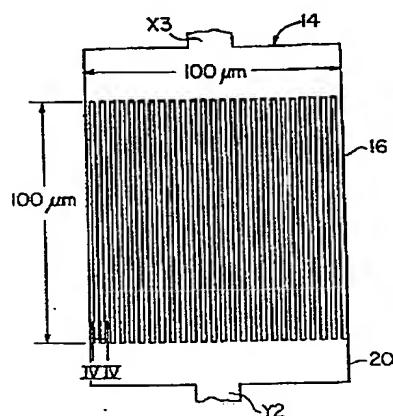
【図6A】



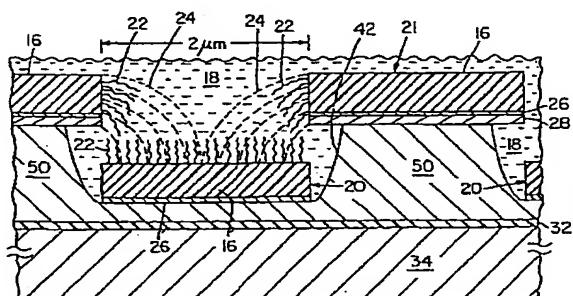
【図6B】



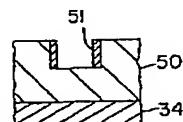
【図3】



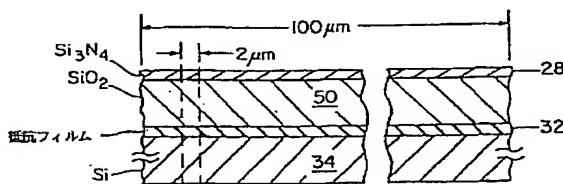
【図4】



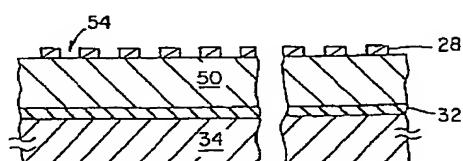
【図6D】



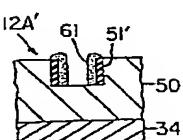
【図5A】



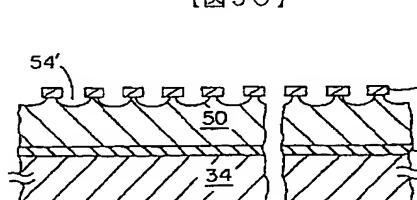
【図5B】



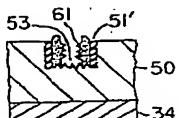
【図6F】



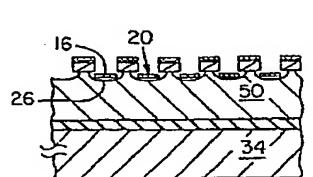
【図5C】



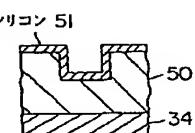
【図6H】



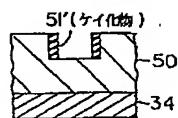
【図5D】



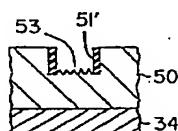
【図6C】



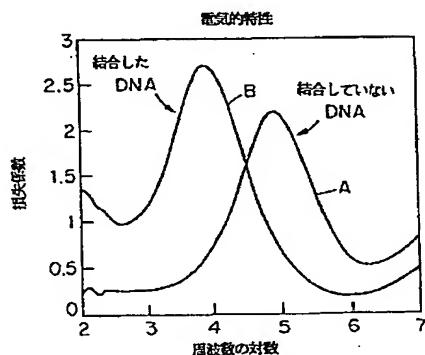
【図6E】



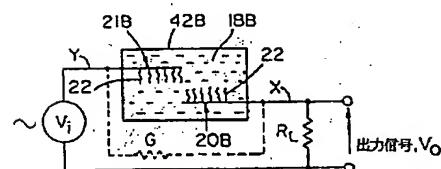
【図6G】



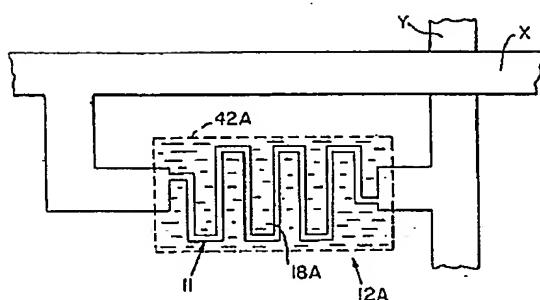
【図7】



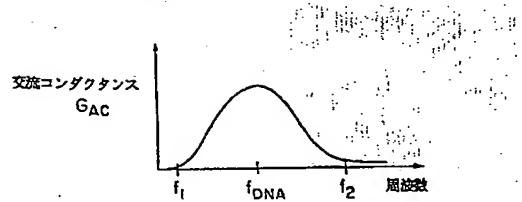
【図9】



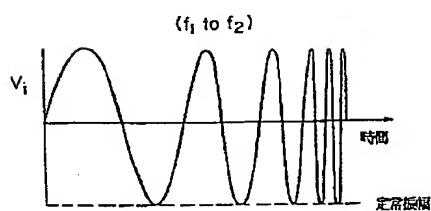
【図8】



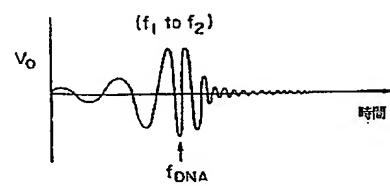
【図10】



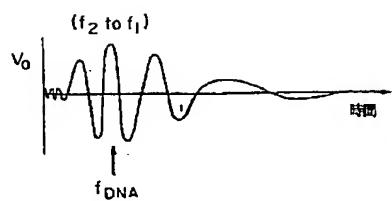
【図11】



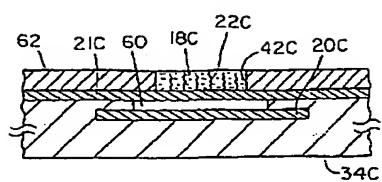
【図12】



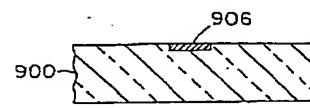
【図13】



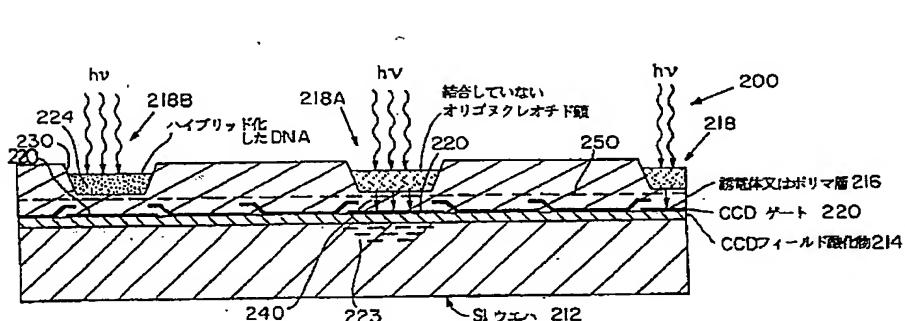
【図14】



【図25A】



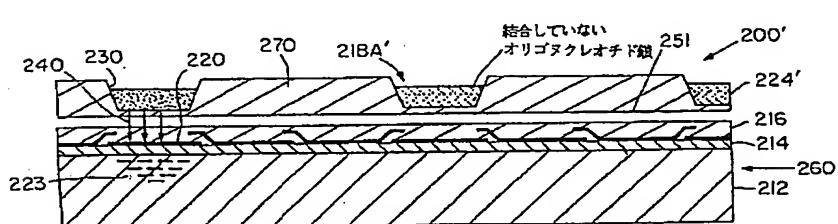
【図15】



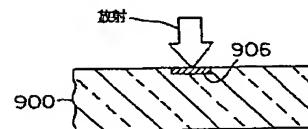
【図25C】



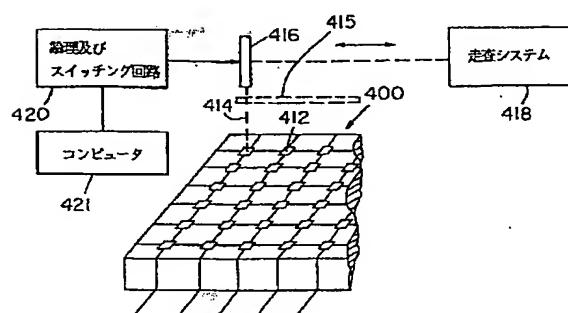
【図16】



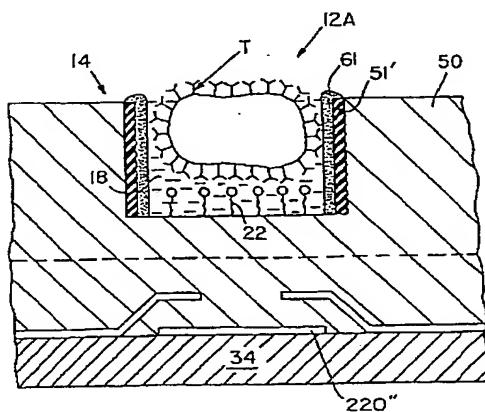
【図25B】



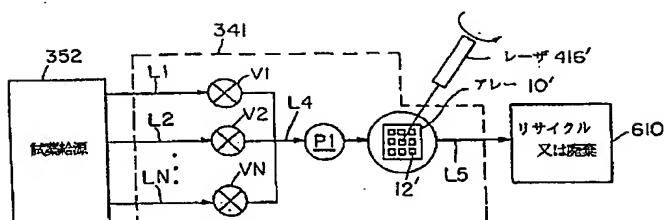
【図17】



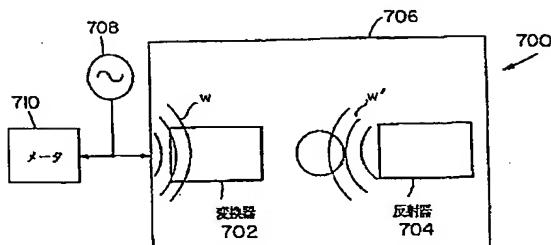
【図22】



【図18】

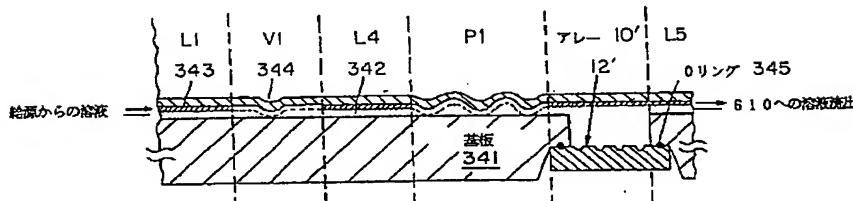


【図23】

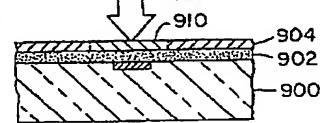


【図25D】

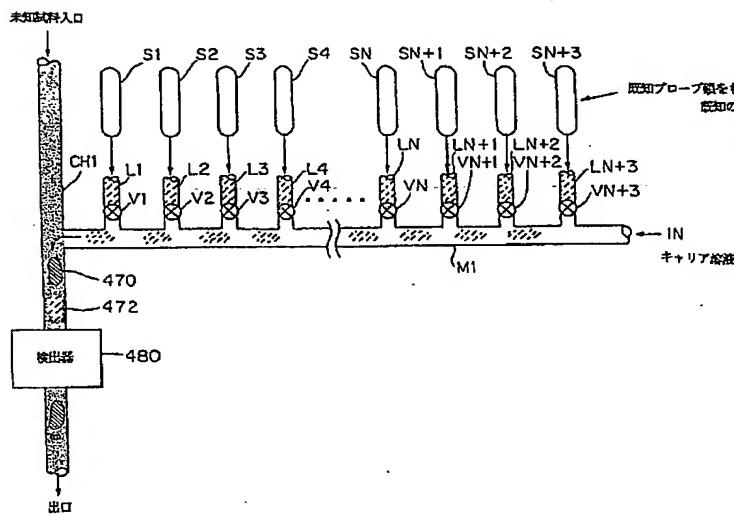
【図19】



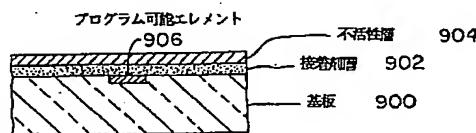
【図26B】



【図20】



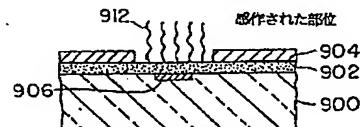
【図26A】



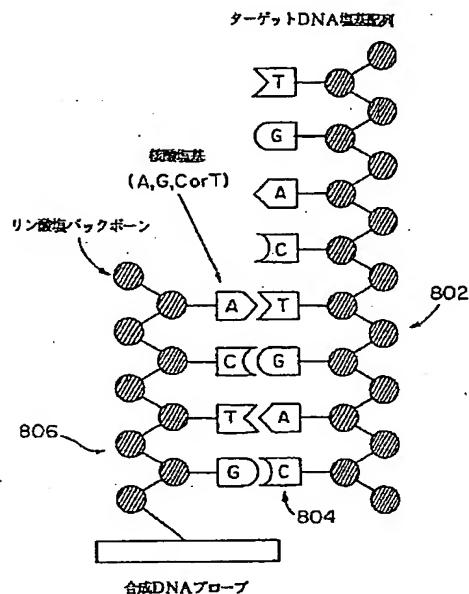
【図26C】



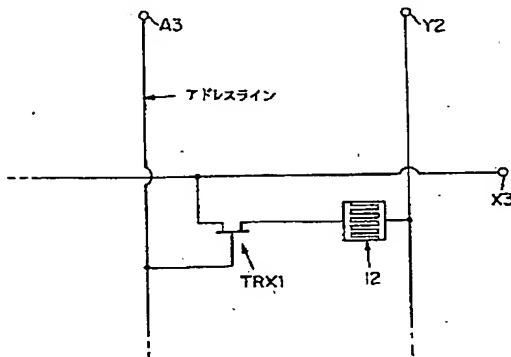
【図26D】



【図21】



【図24】



【手続補正書】

【提出日】平成14年10月3日(2002.10.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】物質中の分子構造の存在を決定する為の下記の要件を具備する装置：

a) 上記物質の供給源；

b) 各種の分子と特定の形で結合する既知の分子を含む溶液の多数の供給源；

c) 上記溶液の各々と上記物質とを選択的に混合する混合手段；および

d) 物質の中での既知の分子と分子構造との間の結合が、混合された溶液内で出現するのを検出する検出器。

【請求項2】請求項1の装置において、検出器が光学的特性の変化を観察することにより結合を検出するものである。

【請求項3】請求項1の装置において、検出器が電気的特性の変化を観察することにより結合を検出するものである。

【請求項4】請求項1の装置において、多数の供給源

が該当の毛細管に含まれ、しかも各毛細管は該当の供給源を上記物質の流れに接続するバルブを持つ。

【請求項5】請求項4の装置において、上記毛細管およびバルブはシリコン中に形成され、且つ1から10ミクロンの範囲の直徑を持つ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】次に、図6A-6Fの模式的なシーケンス断面図に、テスト部位12Aを作る為の上記に代わるプロセスが、関連して記載されている。注：特記されぬ限り、層の厚みは図5A-5Dに示された値と同じである。SiO₂層50がSi基板34上で成長せしめられる(図6A)。SiO₂フィルムは、エッチングされることにより、2ミクロンの周期的な間隔を互いの間に持つ2ミクロン幅の凹部54のアレーが形成される(図6B)。フォトリソグラフィー及び反応性イオンエッチングが約0.5ミクロンの深さ迄使用されることにより、凹部54が形成される。約2000Åのポリシリコンフィルム51が、例えばCVDにより、SiO₂層50上に形成される(図6C)。凹部の底および表面上のフィルム51の領域は、ポリシリコン51の側壁を残して、

反応性イオンエッティング(図6D)により除去される。側壁は、W、Ti又はPtを用いたケイ化物化により、選択的にメタライジング51'される(図6E)。最後に、Ni又はAu電極61がケイ化物側壁51'上に無電解メッキにより形成される(図6F)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正内容】

【0044】H. 表面弾性波又は電磁波検出法

同様のクラスの共振アレー検出器は、例えば表面弾性波(SAW)又は表面電磁波に用いることで、表面波素子により構成されることが出来る。SAW検出器の場合には図23に示される如く、共振構造700は音響変換器702及びSAW反射器704を用いて形成される。波源708からの走査された周波数の波Wは、音響媒体706(出来ればニオブ酸リチウム又は石英結晶)を通して発射される。反射器704は独立した空洞共振を誘発し、且つこの共振は、メータ710に於いて、変換器で消費された電力を計測することにより検出される。テスト部位712は、媒体上に形成される。

* 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正内容】

【0060】図15及び16の構造では、熱的性質は従来の可視波長又は赤外線検出装置アレーの中の熱により発生するノイズからもモニタリングが可能である。この場合には、生化学反応により生じた熱は薄い構造体の層を通じて伝熱作用により伝えられ、且つ電極220の上のノイズバースト(noise burst)として捉えられる。アレーは又、図15の構造に於いて赤外線、可視光線又は紫外線をフラッド照射される(flood-irradiated)ことも出来る。この場合に、光は、物体の状態(例えばハイブリッド化したDNA)の持つ吸収帯域内に於いて特定的に選ばれる。非反応状態では、フラッド照射は凹部を通して伝達され、且つフィルター250により反射される。必要な反応の生じた凹部は、フラッド照射波長に於いて吸収性を持つことになる。吸収の行われた後に、フラッド照射は自動的に熱に変換し、且つ反応凹部部位の下の装置の中に伝えられた後に検出される。

フロントページの続き

(51) Int.CI.⁷ 識別記号
G 01 N 37/00 102

F I テーマコード(参考)
G 01 N 27/46 A

(71)出願人 597050174
ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン
Baylor College Of Medicine
アメリカ合衆国、テキサス州 77030, ヒューストン、ベイラー・プラザ 1

(72)発明者 マーフィー・アール・アレン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01719, ボックスボロ、ヒル・ロード 411

(71)出願人 502323715
ヒューストン・アドバンスト・リサーチ・センター
アメリカ合衆国、テキサス州 77381,
ザ・ウッドランズ、リサーチ・フォレスト
ト・ドライブ 4800

(72)発明者 コシキ・バーナード・ビー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01720, アクトン、フォート・ボンド・ロード 39

(72)発明者 ホリス・マーク・エイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01742, コンコード、スタフォードシャー・レーン 45

(72)発明者 ラスマン・デニス・ディー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01721, アッシュランド、イースト・ブランド・ロード 42

(72)発明者 エーリック・ダニエル・ジェイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
02173, レキシントン、グラント・ブレイ

(72)発明者 チェン・チャンリー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01776, シュドベリー、プラット・ミル・ロード 19

(72)発明者 マシューズ・リチャード・エイチ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
01824, チェルムスフォード、ワイルデン・ロード 30

(72)発明者 バーク・バリー・イー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州
02173, レキシントン, シェアバーン・ロ
ード 17
(72)発明者 エガース・ミッチ・ディー
アメリカ合衆国、テキサス州 77381,
ザ・ウッドランズ、ブラム・コープ・コー
ト 10

(72)発明者 ホーガン・ミッチャエル・イー
アメリカ合衆国、テキサス州 77381,
ザ・ウッドランズ、ゴールデン・シャド
ー・サークル 103
(72)発明者 バーマ・ラジェンダー・シン
アメリカ合衆国、テキサス州 77381-
2526, ザ・ウッドランズ、スパーウッド・
コート 8

F ターム(参考) 2G060 AA06 AA15 AE40 AF06 AF11
HC13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ~~FADED TEXT OR DRAWING~~**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ~~GRAY SCALE DOCUMENTS~~**
- ~~LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT~~**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.